

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 06 October 2000 (06.10.00)	
International application No. PCT/AT00/00040	Applicant's or agent's file reference R 36247
International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00)	Priority date (day/month/year) 18 February 1999 (18.02.99)
Applicant ALTMANN, Friedrich	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
13 September 2000 (13.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Kiwa Mpay
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Frist f. IDS von 36247: 13.4. vpm 13.5. me



EPA/EPO/OEB
D-80298 München
+49 89 2399-0
TX 523 656 epmu d
FAX +49 89 2399-4465

Europäisches
Patentamt

Eur pean
Patent Office

Office eur péen
des brevets

Generaldirektion 2

Directorate General 2

Direction Générale 2

Telefonnummern:

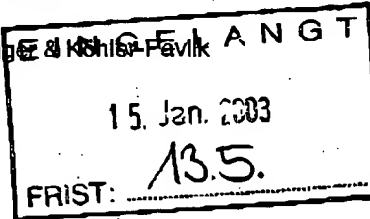
Zweigstelle Den Haag

Beauftragter Prüfer:
(Sachprüfungsfagen)

+31 70 340-4078

Formalsachbearbeiter/Assistent +31 70 340-2667
(Formalangelegenheiten
und andere Fragen)

Alg., Daniel, Mag. Dr. rer.nat.
Patentanwälte
Sonn, Pawloy, Weinzing & Köhler-Pavlik
Riemergasse 14
1010 Wien
AUTRICHE



vpm 13.4.
+ 6.5. me



Anmeldung Nr. 00 904 677.2-1212	Zeichen R 36247	Datum 13.01.2003
Anmelder/Patentinhaber Altmann, Friedrich		

Bescheid gemäß Artikel 96(2) EPÜ

Die Prüfung der obengenannten Anmeldung hat ergeben, daß sie den Erfordernissen des Europäischen Patentübereinkommens aus den beigefügten Gründen nicht genügt. Werden die genannten Mängel nicht behoben, so kann die Anmeldung nach Artikel 97(1) EPÜ zurückgewiesen werden.

Sie werden aufgefordert, innerhalb einer Frist

von 4 Monaten

gerechnet von der Zustellung dieses Bescheides, Ihre Stellungnahme einzureichen und die angeführten Mängel, soweit diese behebbar sind, zu beseitigen. Die Frist berechnet sich nach den Bestimmungen der Regeln 78(2), 83(2) und (4) EPÜ.

Änderungen zur Beschreibung, zu den Ansprüchen und den Zeichnungen sind innerhalb der genannten Frist in einem Exemplar auf gesonderten Blättern (Regel 36(1) EPÜ) einzureichen.

Unterlassen Sie es, auf diese Aufforderung rechtzeitig zu antworten, so gilt die europäische Anmeldung als zurückgenommen (Artikel 96(3) EPÜ).



MACCHIA G
Beauftragter Prüfer
für die Prüfungsabteilung

Anlage(n): 5 Seite/n.Gründe (Form 2906)

The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (41): 26729-26738.

The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (30): 28058-28067.



Beschuld/Protokoll (Anlage)

Communication/Minutes (Annex)

Notification/Procès-verbal (Annexe)

Datum
Date
13.01.2003Blatt
Sheet
Feuille
1Anmelde-Nr.:
Application No.: 00 904 677.2
Demande n°:

Der Prüfung werden **folgende Anmeldungsunterlagen** zugrunde gelegt:

In der Fassung für die Vertragsstaaten:

AT BE CH LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

Beschreibung, Seiten:

1-42 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-26 eingegangen am 25.11.2002 mit Schreiben vom 19.11.2002

Zeichnungen, Blätter:

1/16-16/16 ursprüngliche Fassung

Folgende Dokumente (D7, D8) werden gemäß den Richtlinien C-VI, 8.9 vom Prüfer eingeführt. Sie sind dem Bescheid als Anlage beigelegt. Die Numerierung wird auch im weiteren Verfahren beibehalten:

✓ D7: KUDO T. et al.: ' Expression cloning and characterization of a novel murine α 1,3-fucosyltransferase, mFuc-TIX, that synthesizes the Lewis x (CD15) epitope in brain and kidney ', THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 9. Oktober 1998, Band 273, Nr. 41, Seiten 26729 - 26738;

✓ D8: FABINI G. et al.: ' Identification of core α 1,3-fucosylated glycans and cloning of the requisite fucosyltransferase cDNA from *Drosophila melanogaster* ', THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 27. Juli 2001, Band 276, Nr. 30, Seiten 28058 - 28067.

Die mit Schreiben vom 19.11.2002 eingereichten Änderungen erfüllen die Erfordernisse des Artikels 123(2) EPÜ.

Die mit Schreiben vom 19.11.2002 eingegangenen Bemerkungen des Anmelders wurden zur Kenntnis genommen.



Bescheid/Protokoll (Anlage)

Communication/Minutes (Annex)

Notification/Procès-verbal (Annexe)

Datum
Date
13.01.2003

Blatt
Sheet
Feuille
2

Anmelde-Nr.:
Application No.: 00 904 677.2
Demande n°:

Artikel 54 EPÜ

- 1). Die Bemerkungen unter **Punkt 1)** des vorherigen Bescheids treffen auf die geänderten Ansprüche nicht mehr zu.

- 2.1). Dokument D7 offenbart ein DNA-Molekül, das die folgende Sequenz "TATCCAGTGCAAGGCGAGGGTTTG " aufweist (D7: Seite 26731). Diese Sequenz ist 80% identisch, im Bereich von Basenpaar (bp.) 5 bis bp. 24. mit der SEQ ID NO:1 der vorliegenden Anmeldung, im Bereich von bp. 1446 bis bp. 1465. Daher fällt dieses DNA-Molekül unter das Ziel des Anspruchs 6. Dieses oben genannte DNA-Molekül wurde in einem Verfahren zur Isolierung eines Gens (mFucTIV), das für eine α 1,3-Fucosyltransferase kodiert, verwendet. Daher fällt dieses Gen " mFucTIV " unter das Ziel des Anspruchs 26. In dieser Hinsicht muß man bemerken, daß der Ausdruck " vorzugsweise " in Ansprüchen 6 und 26 mißverständlich und vage ist und keine Beschränkung des Schutzzumfangs des Patentanspruchs bewirkt (Richtlinien, C-III, 4.6).

- 2.2). Mit Rücksicht auf diese Gründe, steht Dokument D7 dem Gegenstand der Ansprüche 6 und 26 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Artikel 54 EPÜ).

Artikel 56 EPÜ

- 3). Die Bemerkungen unter **Punkten 2.1)-2.5)** des vorherigen Bescheids werden nicht beibehalten.

Artikels 83 und 84 EPÜ

- 4). Die Bemerkungen unter **Punkt 3)** des vorherigen Bescheids (siehe Punkt VIII, Abschnitt 2) des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht) werden nicht beibehalten.



Bescheld/Protokoll (Anlage)

Communication/Minutes (Annex)

Notification/Procès-verbal (Annexe)

Datum
Date
13.01.2003Blatt
Sheet
Feuille
3Anmelde-Nr.:
Application No.: 00 904 677.2
Demande n°:

- 5.1). Der geltende Patentanspruch 1 (insofern er ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 betrifft) bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher DNA-Moleküle, die durch die folgenden, erstrebenswerten Eigenheiten oder Eigenschaften, nämlich daß diese Sequenzen für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität kodieren oder dazu komplementär sind, charakterisiert werden.

Der Patentanspruch umfaßt daher alle DNA-Moleküle mit der oben genannten 50% Homologie, die diese Eigenheiten oder Eigenschaften aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Artikel 84 EPÜ nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte Stützung liefert.

In der Tat, offenbart vorliegende Anmeldung nur die Sequenz gemäß SEQ ID NO:1.

In dieser Hinsicht, ist die Prüfungsabteilung der Meinung, daß der Fachmann mit Hilfe der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung, eine große Zahl möglicher DNA-Moleküle, die zumindest 50% Homologie mit SEQ ID NO:1 aufweisen, isolieren könnte. Allerdings würde es für den Fachmann unmöglich sein ohne unzumutbaren Aufwand die Sequenzen, die unter das Ziel des Anspruchs 1 fallen, zu identifizieren (Artikel 83 EPÜ; Richtlinien C-II, 4.9).

Obige Bemerkung gilt *mutatis mutandis* auch für den Gegenstand des Anspruchs 26.

- 5.2). Hinsichtlich der Bemerkungen des Anmelders auf Seite 3 des Schreibens vom 19.11.2002, über die α 1,3-Fucosyltransferase aus *Physcomitrella patens*, muß man bemerken, daß dieses Enzym 57% Identität mit der **Aminosäuresequenz** (so behauptet der Anmelder) und **nicht** mit der **DNA-Sequenz** der erfindungsgemäßen α 1,3-Fucosyltransferase aufweist. Daher betrachtet die Prüfungsabteilung diese α 1,3-Fucosyltransferase aus *Physcomitrella patens* nicht wichtig für die Prüfung des Gegenstands des Anspruchs 1.

- 5.3). Daher erfüllen die geltenden Patentansprüche 1 (insofern er ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 betrifft) und 26 nicht die Erfordernisse der Artikels 83 und 84 EPÜ, weil deren Gegenstand nicht genügend offenbart und gestützt ist.

Um diesen Einwand auszuräumen, sollte der Anmelder in Anspruch 1 den Ausdruck "oder zumindest 50% Homologie zur oben genannten Sequenz



Beschuld/Protokoll (Anlage)

Communication/Minutes (Annex)

Notification/Procès-verbal (Annexe)

Datum
Date

13.01.2003

Blatt
Sheet
Feuille

4

Anmelde-Nr.:
Application No.: 00 904 677.2
Demande n°:

aufweist " streichen.

Die Bemerkung bezüglich des Anspruchs 26 scheint in keinster Weise lösbar zu sein (siehe auch die Bemerkungen unter Punkten 2.1)-2.2), 6) und 7)).

- 6). Die Bemerkungen unter **Punkt 4)** des vorherigen Bescheids treffen auf die geänderten Ansprüche 16, 17 und 21-23 nicht mehr zu.
Die Bemerkungen unter **Punkt 4)** des vorherigen Bescheids treffen noch auf den geänderten Anspruch **26** zu. Die DNA-Moleküle von Anspruch 26 sind noch durch ein Verfahren zur ihren Isolierung gekennzeichnet.
- 7). Weiterhin, wurden die Ansprüche 1 und 26 als getrennte, unabhängige Ansprüche abgefaßt.
Nach Artikel 84 in Verbindung mit Regel 29(2) EPÜ darf eine Anmeldung nur dann mehr als einen unabhängigen Patentanspruch in einer bestimmten Kategorie enthalten, wenn der beanspruchte Gegenstand unter eine der in Regel 29(2) EPÜ Buchstaben (a), (b) oder (c) genannten Ausnahmesituationen fällt, der nicht der Fall ist.
- 8.1). Die Bemerkungen unter **Punkt 5)** des vorherigen Bescheids werden beibehalten.
Im Schreiben vom 19.11.2002 behauptet der Anmelder, daß im Beispiel B gezeigt wird, daß FucTA aus *Drosophila melanogaster* ein Homolog der erfindungsgemäßen Fucosyltransferase ist.
Dokument D8 aber weist oben genannte FucTA aus *Drosophila melanogaster* auf, und behauptet: " the overall identity of *Drosophila* homologues with mammalian and plant α 1,3-fucosyltransferases is not significantly high..... " (D7: Seite 28064).
Daher ist die Prüfungsabteilung der Meinung, daß vorliegende Anmeldung keine technische Offensichtlichkeit bringt, daß ein DNA-Molekül **gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5**, aus Insektenzellen isoliert werden könnte.
- 8.2). Daher erfüllt der geltende Patentanspruch 12 (insofern er ein Verfahren zur Herstellung einer cDNA aus Insekten betrifft) nicht die Erfordernisse der Artikels 83 und 84 EPÜ, weil dessen Gegenstand nicht genügend offenbart und gestützt ist. Obige Bemerkung gilt auch für den Gegenstand der Ansprüche **14-17, 20-23, 25 und 26**.



Bescheld/Protokoll (Antage)

Communication/Minutes (Annex)

Notification/Procès-verbal (Annexe)

Datum
Date
Date 13.01.2003Blatt
Sheet
Feuille 5Anmelde-Nr.:
Application No.: 00 904 677.2
Demande n°:

Um diesen Einwand auszuräumen, sollte der Anmelder die Ausdrücke " Insekt " und " Insektenzellen " streichen.

- 9.1). Die Bemerkungen unter **Punkt 6)** des vorherigen Bescheids werden beibehalten. Im Schreiben vom 19.11.2002 behauptet der Anmelder: " die Primer gemäß Anspruch 12 sind aufgrund der in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Sequenz SEQ ID NO:1 ausreichend offenbart ". Anspruch 12 aber zitiert nur den Ausdruck " Primern ". Dieser Ausdruck " Primern ", ohne andere technische Merkmale, ermöglicht dem Fachmann nicht, festzustellen, welche technischen Merkmale für den Primer notwendig sind, um das Verfahren von Anspruch 12 durchzuführen (Artikel 84 EPÜ; Richtlinien C-III, 4.1).

- 9.2). Daher, erfüllt der Anspruch 12 nicht die Erfordernisse des Artikels 84 EPÜ. Um diesen Einwand auszuräumen, sollte der Anmelder im Anspruch 12, eine Kennzeichnung dieses Primers durch technische Merkmale einführen.

Dem Anmelder wird die Einreichung neuer Ansprüche anheimgestellt, die den vorstehenden Bemerkungen Rechnung tragen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß die Anmeldung nicht in der Weise abgeändert werden darf, daß ihr Gegenstand über den Inhalt der Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht (Artikel 123(2) EPÜ).

Um die Prüfung von geänderten Anmeldungsunterlagen im Hinblick auf Artikel 123(2) EPÜ zu erleichtern, wird der Anmelder gebeten, die durchgeführten Änderungen, unabhängig davon, ob es sich um Änderungen durch Hinzufügen, Ersetzen oder Streichen handelt, deutlich aufzuzeigen und anzugeben, auf welche Stellen in der ursprünglich eingereichten Anmeldung sich diese Änderungen stützen.

Gegebenenfalls können diese Angaben in handschriftlicher Form auf Kopien der betreffenden Teile der ursprünglichen Anmeldung erfolgen.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen **CT/AT 2000/040**

Internationales Anmeldedatum **17. Feb. 2000**

Österreichisches Patentamt
Einlauf- u. Abgangsstelle
A-1014 Wien, Kohlmarkt 8-10 CSANDL
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **R 36247**

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Fucosyltransferase-Gen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ALTMANN, Friedrich
Institut für Chemie
Universität für Bodenkultur
Muthgasse 18
A-1190 Wien (AT)

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:



Anwalt



gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SONN Helmut, WEINZINGER Arnulf, PAWLOY Peter,
ALGE Daniel, KÖHLER-PAVLIK Johann

Riemergasse 14
A-1010 Wien (AT)

Telefonnr.:

+43 1 512 84 05

Telefaxnr.:

+ 43 1 512 98 05

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

FEB. 2000

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) R 36247

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Fucosyltransferase-Gen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders; sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

ALTMANN, Friedrich
Institut für Chemie
Universität für Bodenkultur
Muthgasse 18
A-1190 Wien (AT)

☒ Diese Person ist
gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☒ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders; sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SONN Helmut, WEINZINGER Arnulf, PAWLOY Peter,
ALGE Daniel, KÖHLER-PAVLIK Johann

Riemergasse 14
A-1010 Wien (AT)

Telefonnr.:

+43 1 512 84 05

Telefaxnr.:

+ 43 1 512 98 05

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **AP** ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA** Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP** Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA** OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 18. Februar 1999 (18.02.99)	A 270/99	AT		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) (1) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA)
(falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA /

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Aktenzeichen

Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 3
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 34
Ansprüche : 6
Zusammenfassung : 1
Zeichnungen : 16
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 8
Blattzahl insgesamt : 68

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
- ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
- ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
- ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
- ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
- ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
- ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
- ☒ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
- ☒ Sonstige (einzeln auflisten): Postempfangschein

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Fig. 7

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:

Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

ALTMANN, Friedrich

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 Wien, Kohlmarkt 8-10, Postfach 95

TEL. +43/(0)1/53424; FAX +43/(0)1/53424-535; TELEX 136847 OEPA A

Postscheckkonto Nr. 5.160.000; UID-Nr. ATU38266407; DVR: 0078018

ANMELDETAG: 1999 02 18

GESCHÄFTSZAHL: A 270/99-1

IPC: C12N

(IN ALLEN EINGABEN ANFÜHREN)

AN ALTMANN FRIEDRICH DR.

IN #OW* A-1190 WIEN

ZU HD.: PAWLOY P. DIPL. ING., ALGE D. MAG DR #WIEN

geben)

IHR ZEICHEN: 35063

EINGELANGT

20. Sep. 1999

Frist bis: 20.11.99

1. Vorbescheid

Auf Grund des Ergebnisses der gemäß § 99 des Patentgesetzes vorgenommenen Vorprüfung werden Sie eingeladen, falls die Anmeldung weiterverfolgt werden sollte, binnen z w e i M o n a t e n nach Zustellung des Vorbescheides sich hierüber zu äußern und

- ☐ die Einheitlichkeit der Anmeldung herzustellen (§ 88 PatG)
- ☒ die angeführten Mängel der Anmeldung zu beheben
- ☒ die in der Beilage angemarkten Korrekturen entsprechend durchzuführen
- ☒ mit Berücksichtigung der Bemängelung folgende Stücke in zweifacher Ausfertigung vorzulegen:

- ☒ neue Patentansprüche (Bezugszeichen!)
- ☐ eine Beschreibungsergänzung/neue Beschreibungsseite(n)
- ☒ angepasste Beschreibung
- ☒ ein (neues) Deckblatt (Vordruck PA 3 I)
- ☐ eine (neue) Zusammenfassung

- ☐ die vorschriftsmäßigen Zeichnungen vorzulegen
- ☐ die Erfindungseigenschaft im Hinblick auf den nachgewiesenen Stand der Technik ausführlich zu begründen
- ☐ im Hinblick auf die Intervallliteratur das Prioritätsrecht nachzuweisen (§ 95 Abs. 3 PatG)

Wird innerhalb dieser Frist weder den erteilten Aufträgen entsprochen, noch eine Äußerung oder ein Antrag auf Verlängerung der Frist überreicht, so gilt die Anmeldung als zurückgenommen. Diese Rechtsfolge tritt außer Kraft, wenn binnen vier Monaten nach Ablauf der Frist den erteilten Aufträgen entsprochen bzw. die Äußerung auf den Vorbescheid nachgeholt und eine Gebühr im Ausmaß der Anmeldegebühr auf das Postscheckkonto Nr. 5.160.000 des Patentamtes eingezahlt wird. Der Antrag auf Verlängerung der Frist unterliegt einer Verfahrensgebühr in der Höhe von 170 S (12,35 €), die nicht in Stempelmarken entrichtet werden darf, sondern auf das Postscheckkonto des Patentamtes eingezahlt werden muß. Wird ein numerierter Erlagschein des Patentamtes verwendet, kann die Zahlung der oben angeführten Gebühren durch Überreichung der Auftragsbestätigung entweder im Original oder in Kopie nachgewiesen werden, andernfalls ist der urschriftliche Einzahlungs- oder Überweisungsbeleg vorzulegen.

Der Antrag auf Verlängerung der Frist ist stempelpflichtig.

Angeschlossen sind: Beschreibung PAZ 4512, Patentansprüche PAZ ,
Beschreibung PAZ , Patentansprüche PAZ ,
Blatt Zeichnungen PAZ ,
Zusammenfassung PAZ , zur Benützung und Wiedervorlage

- ☒ Vordruck PA 3 I zweifach
- ☐ Vordruck PA 3h
- ☐ Anwaltsverzeichnis

Ergebnis der Vorprüfung umseitig !

Österreichisches Patentamt
Technische Abteilung XVI
Wien, am 30. August 1999
(Mag. Mosser)
Dipl. Ing. Wolf

Mit dem vorliegenden Patentanspruch 8 wird im Zusammenhang mit Anspruch 6 u. a. Patentschutz für DNA-Moleküle mit weniger als 20 Basenpaaren angestrebt. Da besonders kurze DNA Stücke nicht mehr spezifisch für bestimmte Gene sind, wäre das Schutzbegehren bezüglich der DNA-Länge nach unten abzugrenzen.

Für den vorliegenden Patentanspruch 11 wäre zu begründen, weshalb ein DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, mit den Gegenständen der vorhergehenden Patentansprüche eine einzige Erfindung bzw. Gruppe von Erfindungen darstellt. Insbesondere wäre zu begründen, inwiefern bei den Gegenständen der vorliegenden Patentansprüche 1 und 11 Einheitlichkeit gegeben ist und somit die Erfordernisse des § 88 PatG und des § 11 PGMMV erfüllt sind.

Bei den vorliegenden Patentansprüchen 17 sowie 26 – 28 können lediglich Aufgabenstellungen ohne die Angabe von Lösungen erkannt werden. Diese Ansprüche sind daher in der vorliegenden Form nicht gewährbar. Darüber hinaus wird zu den Ansprüchen 26 – 28 bemerkt, dass ein Produkt i.d.R. nicht durch seine Herstellung, sondern nur durch seine Zusammensetzung beschrieben werden kann.

Beim Patentanspruch 35 kann keine erfinderische Idee erkannt werden. Dem Anspruch ist lediglich entnehmbar, dass GlcNAc-alpha 1, 3-Fucosyltransferase eingesetzt wird, um Fucose an Kohlenhydrateinheiten oder an Glykoproteine zu binden.

Dies ist als trivial anzusehen. Fucosylierungen werden z.B. auch in der EP 643 132 A1 und in der US 5 272 066 A beschrieben. Dass geeignete Biomoleküle solcherart modifiziert werden können, dass sie Biomolekülen pflanzlichen Ursprunges ähneln, erscheint aufgrund der Beschreibung (Seite 2) naheliegend.

Der vorliegende Anspruch wäre daher einzuschränken, z.B. dadurch, dass die Transferase durch ihren genetischen Code, z.B. durch Rückbeziehung auf vorhergehende Ansprüche (z.B. Anspruch 1), näher charakterisiert wird.

Hinsichtlich geringfügiger verbesserungsbedürftiger Stellen in den Patentansprüchen und in der Beschreibung wird auch auf die Bleistiftanmerkungen im mitfolgenden Amtsexemplar verwiesen.

Zum bekannten Stand der Technik wurden folgende Druckschriften in Betracht gezogen:

Nature Biotechnology 15:414-415; 1997

Nature Biotechnology 16:857-861; 1998

US 5272066 A (BERGH et al.) 21.12.1993

EP 643132 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 15.03.1995

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 36247	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 00/ 00040	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/02/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 18/02/1999
Anmelder ALTMANN, Friedrich		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/11 C12N9/00 C12N5/10
C12P21/00 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>STAUDACHER E. ET AL.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha-1,3-fucosyltransferase from mung beans"</p> <p>GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 12, 1995, Seiten 780-786, XP002140246</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Seite 782, linke Spalte, Absatz 3</p> <p>Seite 783, linke Spalte</p> <p>Seite 785 -Seite 786</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	32-34



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

19/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 14, 1997, Seiten 643-646, XP002140795 Seite 645, linke Spalte, Absatz 3 ---	25-28
X	LEROUGE P. ET AL.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 38, 1998, Seiten 31-48, XP002140796 in der Anmeldung erwähnt Seite 44 -Seite 45 ---	25-28
X	EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997 72% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1102 bis bp.1596, in inverser Orientierung XP002140249 das ganze Dokument ---	1,3,6, 8-10,12
X	EMBL Database ID: A0158899 AC: A0158899 Oryza sativa 09/09/1998 63% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.591 bis bp.776 XP002140250 das ganze Dokument ---	1,6,8, 10,12
X	EMBL Database ID: A0328306 AC: A0328306 Oryza sativa 11/01/1999 65% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1486 bis bp.1718, in inverser Orientierung XP002140251 das ganze Dokument ---	1,6, 8-10,12
P,X	LEITER H. ET AL.: "Purification, cDNA cloning and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha-1,3-Fucosyltransferase from mung bean" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 31, 30. Juli 1999 (1999-07-30), Seiten 21830-21839, XP002140245 das ganze Dokument ---	1-8,13, 14,29-34
	---	-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>EMBL Database ID: VRA18529 AC: Y18529 Vigna radiata mRNA für alpha-1,3-fucosyltransferase (FucT c3) 03/08/1999 99.8% Identität mit SEQ ID NO 1 bp. 1 bis bp. 2198 XP002140629 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-5, 10, 31-33
A	<p>STAUDACHER E.: "alpha1,3-fucosyltransferases" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, Bd. 8, Nr. 44, November 1996 (1996-11), Seiten 391-408, XP000921149 Seite 400, linke Spalte, Absätze D-4. Seite 401 -Seite 402 Seite 404 -Seite 405</p> <p>---</p>	
A	<p>STAUDACHER E. AND MÄRZ L.: "Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 15, 1998, Seiten 355-360, XP002140247 in der Anmeldung erwähnt Seite 356, rechte Spalte, Absatz 2</p> <p>---</p>	34
A	<p>CRAWLEY S.C. ET AL.: "A plant fucosyltransferase with human Lewis blood-group specificity" CARBOHYDRATE RESEARCH, Bd. 193, 1989, Seiten 249-256, XP002140248</p> <p>---</p>	
A	<p>JAMES D.C. ET AL.: "N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems" BIO/TECHNOLOGY, Bd. 13, Nr. 6, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 592-596, XP000609442 ISSN: 0733-222X Seite 595, linke Spalte, Absatz 3</p> <p>-----</p>	25-28

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

#10/38
ST
2/22/02

9/913858

Applicant's or agent's file reference R 36247	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/AT00/00040	International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00)	Priority date (day/month/year) 18 February 1999 (18.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54		
Applicant ALTMANN, Friedrich		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 September 2000 (13.09.00)	Date of completion of this report 12 June 2001 (12.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT00/00040

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-42, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-33, filed with the letter of 26 March 2001 (26.03.2001)
- ☒ the drawings:
 pages 1/16-16/16, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT00/00040

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

SEE SEPARATE SHEET

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box IV.3

1. The different inventions are as follows:

a) Claims 1-23 and 28-33:

Preparation of GlcNAc- α -1,3-fucosyltransferase, related products, process.

b) Claims 24-27:

Recombinant glycoproteins and related pharmaceutical compositions.

2.1 These inventions are not so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1) for the following reasons:

A preparation of GlcNAc- α -1,3-fucosyltransferase as per one of Claims 31 and 32 is already known (see the reasons for this objection in Box V below). The special technical feature that determines the contribution made by the first invention to the prior art is the nucleic acid which encodes the GlcNAc- α -1,3-fucosyltransferase. Claims 24-27 do not include either this feature or any corresponding technical feature. The application fails to meet the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) because there is no technical relationship between the two inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features (PCT Rule 13.2).

2.2 Despite this, a full search report was compiled for the two inventions. Since a complete international preliminary examination can be carried out without undue difficulty, the IPEA has decided to waive the request to either restrict the claims or pay additional fees.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT 00/00040

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23, 28-30	YES
	Claims	24-27, 31-33	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23, 28-30 (in part)	YES
	Claims	1-33 (1-23, 28-30 in part)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-33	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

- D1: STAUDACHER E. et al.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: β -N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNac) α -1,3-fucosyltransferase from mung beans", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Vol. 12, 1995, pages 780-786, XP002140246
- D2: ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins?", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Vol. 14, 1997, pages 643-646, XP002140795
- D3: LEROUGE P. et al.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 38, 1998, pages 31-48, XP002140796

2.1 Document D1 discloses a GlcNac α -1,3-fucosyltransferase from mung beans, characterised in that it has a pI value of around 8.5 (see D1, page 783).

D1 also discloses a process for preparing mung-bean-specific carbohydrate units from human and other vertebrate glycoproteins, characterised in that carbohydrate units including peptides from bovine fibrin (GnGn) or human IgG (GnGnF⁶), fucose units and a GlcNac α -1,3-fucosyltransferase are added to a substrate acceptor, with the result that

fucose in the α -1,3 position is linked to the carbohydrate unit by the GlcNAc α -1,3-fucosyltransferase (see D1, pages 781-782).

- 2.2 The subject matter of Claims 31 and 32 thus lacks novelty (PCT Article 33(2)) because a parameter (the pI value) is not enough to delimit a product unambiguously against the prior art (PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.7a).

In the light of the above, the subject matter of Claim 33 also lacks novelty (PCT Article 33(2)) since the characterising technical features do not permit any distinction to be made between the process known from D1 and the process according to Claim 33.

Moreover, the applicant should note that the GlcNAc α -1,3-fucosyltransferase defined in Claims 31 and 32 (and the GlcNAc α -1,3-fucosyltransferase defined in Claim 33) cannot be novel simply because the process by which it is produced is potentially novel.

- 3.1 Document D2 discloses a recombinant glycoprotein (human glucocerebrosidase) and a pharmaceutical composition containing it, characterised in that the glycoprotein contains the glycans Man3GlcNAc2(Fuc) (see D2, page 645). This glycan structure is the same structure that is found in insect glycoproteins, and does not contain any α -1,3-linked fucose residues (see D2, Figure 2).

Given that a product (the aforementioned glycoprotein) cannot be novel simply because the process by which it is prepared is potentially novel, document D2 is prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 24-27 of the present application (PCT Article 33(2)).

- 3.2 Document D3 discloses a recombinant glycoprotein (the murine monoclonal antibody Guy's 13) and a pharmaceutical composition containing it, characterised in that the

glycoprotein does not contain any α -1,3-linked fucose residues (see D3, page 44).

Document D3 is therefore prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 24 and 27 of the present application (PCT Article 33(2)).

- 4.1 Document D1, which is considered to be the prior art closest to the first invention, discloses a GlcNac α -1,3-fucosyltransferase from mung beans. The subject matter of Claim 1 differs in that it discloses the DNA molecule which encodes GlcNac α -1,3-fucosyltransferase.

The subject matter of Claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

- 4.2 The problem addressed by the application can thus be seen as that of providing a DNA molecule which encodes GlcNac α -1,3-fucosyltransferase.
- 4.3 Insofar as it relates to a DNA molecule with the sequence according to SEQ ID No. 1, the solution proposed in Claim 1 involves an inventive step (PCT Article 33(3)) because the obtaining of a DNA molecule with the sequence according to SEQ ID No. 1 cannot be derived in an obvious way from the prior art.
- 4.4 Insofar as it relates to a DNA molecule which is at least 50% homologous to the sequence according to SEQ ID No. 1, and also insofar as it relates to hybridising and degenerated sequences, the solution proposed in Claim 1 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)) because the obtaining of such a DNA molecule from the fucosyltransferase according to D1 is an obvious and routine laboratory procedure.
- 4.5 Claims 2-7 are dependent on Claim 1 and therefore also meet the PCT requirement of novelty (PCT Article 33(2)).

Insofar as they relate to a DNA molecule with the sequence according to SEQ ID No. 1, Claims 2-7 also meet the PCT requirement of inventive step (PCT Article 33(3)).

Insofar as they relate to a DNA molecule which is 70-80% homologous to the sequence according to SEQ ID No. 1, and also insofar as they relate to hybridising and degenerated sequences, Claims 2-7 do not meet the PCT requirement of inventive step (PCT Article 33(3)) (for the reasons given in point 4.4 above).

- 4.6 For the reasons given in points 4.1 to 4.4 above, the products and processes according to Claims 8-23 and 28-30, which are related to the DNA molecule according to Claim 1, are novel (PCT Article 33(2)).

Insofar as they relate to a DNA molecule with the sequence according to SEQ ID No. 1, the said products and processes involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Insofar as they relate to a DNA molecule which is at least 50% homologous to the sequence according to SEQ ID No. 1, and also insofar as they relate to hybridising and degenerated sequences, the said products and processes do not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

5. The subject matter of Claims 1-33 is considered to be industrially applicable (PCT Article 33(4)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The following observations are made in connection with PCT Article 6.
2. The subject matter of Claims 1 and 5 is not clearly identifiable because the hybridising and washing conditions are not specified. Claims are supposed to be interpreted "giving the individual words the meaning and scope which they normally have in the relevant art, unless in particular cases the description gives the words a special meaning, by explicit definition or otherwise" (PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.2). In this instance, a person skilled in the art would be aware that the expression "rigorous conditions" was not sufficient to allow a clear understanding of the conditions in question because the term "rigorous" gives no indication as to how such conditions can be ensured. Even expressions such as "highly rigorous", "moderately rigorous" and "with little rigourousness" would be misunderstood and would not conform to the stipulation in Chapter III-4.5 of the PCT Examination Guidelines.
3. The subject matter of Claims 16 and 17 (plants/plant cells and insects/insect cells) and of Claims 24-27 (glycoproteins), Claim 30 (a DNA molecule which encodes a fucosyltransferase) and Claims 31 and 32 (fucosyltransferase) is characterised by a production process.

Claims relating to products which are characterised by their production processes (known as "product-by-process claims") are only admissible if the products themselves meet the requirements for patentability and if the application does not contain any other information that would allow the applicant to characterise the product

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT 00/00040

VIII. Certain observations on the international application

adequately in terms of its composition, structure or other verifiable parameters.

In this instance it would be possible to characterise the plants/plant cells and insects/insect cells and also the glycoproteins, the DNA molecule and the fucosyltransferase in terms of their technical features (the vector contained in the cells, and the amino acid or DNA sequence).

This observation also applies to Claims 21-23 and 33.

09/1913858

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 14 JUN 2001

WIPO

RECEIVED

TECH CENTER

NOV 09 2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 36247	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT00/00040	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 18/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/54		
Anmelder ALTMANN, Friedrich		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter Macchia, G Tel. Nr. +31 70 340 4078 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-42 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-33 eingegangen am 26/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/16-16/16 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

8, eingereicht mit Schreiben vom 18/05/2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT00/00040

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfind erischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23, 28-30
	Nein: Ansprüche	24-27, 31-33
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23, 28-30 teilweise
	Nein: Ansprüche	1-33 (1-23 und 28-30 teilweise)
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-33
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1). Die verschiedenen Erfindungen sind:

a) Ansprüche 1-23, 28-33:

Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, verwandte Produkte und Verfahren;

b) Ansprüche 24-27:

Rekombinante Glykoproteine und verwandte pharmazeutische Zusammensetzungen.

2.1). Aus den folgenden Gründen hängen diese Erfindungen nicht so zusammen, daß sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT): eine Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase gemäß einem der Ansprüche 31 und 32 ist bereits bekannt (siehe die Gründe für diesen Einwand). Das besondere technische Merkmal, das den Beitrag der ersten Erfindung zum Stand der Technik bestimmt, ist die Nukleinsäure, die für die obengenannte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert. Weder dieses noch ein entsprechendes technisches Merkmal ist in den Ansprüchen 24-27 enthalten. Die erforderliche Einheitlichkeit der Erfindung (Regel 13.1 PCT) ist damit insofern nicht mehr gegeben, als zwischen den Gegenständen der zwei obengenannten Erfindungen kein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT besteht, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmalen zum Ausdruck kommt.

2.2). Trotzdem wurde für obengenannte Erfindungen ein vollständiger Recherchenbericht erstellt. Da eine vollständige internationale Prüfung ohne übermäßigen Arbeitsaufwand durchgeführt werden kann, sieht die Internationale Prüfungsbehörde von einer Aufforderung zur Einschränkung oder zur Entrichtung zusätzlicher Gebühren ab.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1). Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: STAUDACHER E. ET AL.: 'Functional purification and characterization of a GDP-fucose: β -N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) α -1,3-fucosyltransferase from mung beans' GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 12, 1995, Seiten 780-786, XP002140246;
- D2: ALTMANN F.: 'More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?' GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 14, 1997, Seiten 643-646, XP002140795;
- D3: LEROUGE P. ET AL.: 'N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends' PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 38, 1998, Seiten 31-48, XP002140796.

2.1). Dokument D1 offenbart eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus Mungobohnen, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pI von ungefähr 8.5 aufweist (D1: Seite 783).

Dokument D1 offenbart auch ein Verfahren zur Herstellung von Mungobohnen-spezifischen Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß zu einem Substrat-Akzeptor Kohlenhydrat-Einheiten umfassend Peptide aus dem Rinderfibrin (GnGn) oder dem menschlichen IgG (GnGnF⁶), Fucose-Einheiten sowie eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, sodaß Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit gebunden wird (D1: Seiten 781-782).

2.2). Der Gegenstand der Ansprüche 31 und 32 ist daher nicht neu (Art. 33(2) PCT), weil ein Parameter (pI Wert) nicht ausreichend ist, um ein Produkt eindeutig vom Stand der Technik abzugrenzen (PCT Richtlinien III-4.7a).

Mit Rücksicht auf diese Gründe, ist der Gegenstand des Anspruchs 33 auch nicht neu (Art. 33(2) PCT), weil die kennzeichnenden technischen Merkmale keine

Unterscheidung zwischen dem Verfahren aus D1 und demjenigen aus Anspruch 33 zulassen.

Im übrigen wird der Anmelder darauf hingewiesen, daß die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus den Ansprüchen 31 und 32 (und diejenige, die in Anspruch 33 genannt ist) nicht schon dadurch neu wird, daß sie durch ein möglicherweise neues Verfahren hergestellt wird.

- 3.1). Das Dokument D2 offenbart ein rekombinantes Glykoprotein (menschliche Glukocerebrosidase) und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Glykoprotein die Glykane Man3GlcNAc2(Fuc) aufweist (D2: Seite 645). Diese Glykanstruktur ist dieselbe Struktur, die in Insektenglykoproteinen gefunden wird, und weist keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste auf (D2: Abbildung 2).

Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß ein Produkt (obengenanntes Glykoprotein) nicht schon dadurch neu wird, daß es durch ein möglicherweise neues Verfahren hergestellt wird, steht Dokument D2 dem Gegenstand der Ansprüche 24-27 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Art. 33(2) PCT).

- 3.2). Das Dokument D3 offenbart ein rekombinantes Glykoprotein (monoklonaler Antikörper Guy's 13 der Maus) und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Glykoprotein keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist (D3: Seite 44).

Daher steht Dokument D3 dem Gegenstand der Ansprüche 24 und 27 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Art. 33(2) PCT).

- 4.1). Das Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik für die erste Erfindung angesehen wird, offenbart eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus Mungobohnen, von der sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch unterscheidet, daß das DNA-Molekül, das für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert, offenbart wird.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist somit neu (Artikel 33(2) PCT).

- 4.2). Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, die Bereitstellung eines DNA-Moleküls, das für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert.

- 4.3). Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung, insofern sie ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 betrifft, beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT), weil die Erhaltung eines DNA-Moleküls mit der Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1, nicht in naheliegender Weise aus dem Stand der Technik abzuleiten ist.
- 4.4). Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung, insofern sie ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen betrifft, beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT), weil die Erhaltung eines solchen DNA-Moleküls aus der Fucosyltransferase von D1 eine naheliegende Laboratoriumpraxis ist.
- 4.5). Die Ansprüche 2-7 sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit (Artikel 33 (2) PCT).
Die Ansprüche 2-7 (insofern sie sich auf ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 beziehen) erfüllen auch die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).
Mit Rücksicht auf die Gründe in der Abschnitt 4.4), erfüllen die Ansprüche 2-7 (insofern sie sich auf ein DNA-Molekül, das 70-80% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 umfasst oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen beziehen) nicht die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).
- 4.6). Mit Rücksicht auf die Gründe in den Abschnitten 4.1-4), sind die Produkte und Verfahren gemäß den Ansprüchen 8-23 und 28-30 der vorliegenden Anmeldung, die dem DNA-Molekül gemäß dem Anspruch 1 verwandt sind, auch neu (Artikel 33(2) PCT).
Sie beruhen auch auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) insofern sie sich auf ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 beziehen.
Sie beruhen nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) insofern sie sich auf ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen beziehen.

- 5). Die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands der Ansprüche 1-33 wird anerkannt (Artikel 33(4) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- 1). Die folgende Bemerkungen werden bezüglich Artikel 6 PCT gemacht.
- 2). Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 5 kann nicht eindeutig identifiziert werden, weil die Hybridisierungs- und Waschbedingungen nicht angegeben werden.
" Der Wortlaut eines jeden Patentanspruchs ist so zu verstehen, daß sich für die einzelnen Wörter die Bedeutung und die Reichweite ergeben, die sie auf dem betreffenden Gebiet normalerweise haben, es sei denn, die Beschreibung verleiht den Wörtern in bestimmten Fällen durch ausdrückliche Definition oder auf andere Weise eine besondere Bedeutung " (PCT Richtlinien III-4.2).
In diesem Fall ist der Fachmann auf dem laufenden, daß der Ausdruck " stringente Bedingungen " nicht ausreichend ist, um den betreffenden Gegenstand eindeutig identifizieren zu können. Da der Ausdruck " stringent " keine Angabe darüber gibt, wie diese Bedingungen erhalten werden können.
Sogar die eventuell gebrauchten Ausdrücke " hohe/mäßige/niedrige stringente Bedingungen ", würde mißverstanden werden, und würden die Erfordernisse der PCT Richtlinien III-4.5 nicht erfüllen.
- 3). Der Gegenstand der Ansprüche 16 und 17 (Pflanzen/Pflanzenzellen bzw. Insekten/Insektenzellen), sowie der Ansprüche 24-27 (Glykoproteine), des Anspruchs 30 (DNA-Molekül, das für eine Fucosyltransferase kodiert), und der Ansprüche 31 und 32 (Fucosyltransferase), ist durch ein Verfahren zu ihrer Herstellung gekennzeichnet.
Ansprüche für Erzeugnisse, die durch ihr Herstellungsverfahren gekennzeichnet sind (sog. "Product- by- process- Ansprüche"), sind nur zulässig, wenn die Erzeugnisse als solche die Voraussetzungen für die Patentierbarkeit erfüllen und die Anmeldung keine anderen Angaben enthält, die es dem Anmelder ermöglichen würden, das Erzeugnis durch seine Zusammensetzung, seine Struktur oder sonstige nachprüfbare Parameter hinreichend zu kennzeichnen.

In diesem Fall gibt es die Möglichkeit, die Pflanzen/Pflanzenzellen und Insekten/Insektenzellen, sowie die Glykoproteine, das DNA-Molekül und die Fucosyltransferase durch ihre technischen Merkmale (der Vektor, der in diesen Zellen enthalten ist, beziehungsweise die Aminosäure- oder DNA Sequenz) zu kennzeichnen.

Obige Bemerkung gilt auch für Ansprüche 21-23 und 33.

WO 00/49153

- 43 -

EPO - DG 1

PCT/AT00/00040

26. 03. 2001

Patentansprüche:

(46)

1. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.
2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, codiert.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 aufweist.
4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare umfasst.
5. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, insbesondere zumindest 95%, Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist.
6. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Teilsequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst und eine Homologie von zumindest 80% zur SEQ ID NO: 1 sowie eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist.

WO 00/49153

- 44 -

PCT/AT00/00040

7. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.

8. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst.

9. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst.

10. DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, dadurch gekennzeichnet, dass es zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird.

11. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 umfasst.

12. Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotylzellen, isoliert wird, mit der nach Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird.

13. Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einen Vektor kloniert wird, der anschließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren.

WO 00/49153

- 45 -

PCT/AT00/00040

14. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest einer der Vektoren gemäß Anspruch 8, 9 oder 11 bzw. ein Vektor umfassend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst, in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird.
15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, dadurch gekennzeichnet, dass das DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst, in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird.
16. Rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 hergestellt sind und dass ihre endogene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.
17. Rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 hergestellt sind und dass ihre endogene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.
18. Peptidnukleinsäure(PNA)-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon ist.
19. Peptidnukleinsäure(PNA)-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon entspricht.

WO 00/49153

- 46 -

PCT/AT00/00040

20. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAC- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass PNA-Moleküle gemäß Anspruch 18 oder 19 in die Zellen eingeschleust werden.
21. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
22. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
23. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
24. Rekombinante Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 21 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykoproteine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.
25. Rekombinante humane Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykopro-
- GEAENDERTES BLATT Ersatzseite

WO 00/49153

- 47 -

PCT/AT00/00040

teine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

26. Rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 23 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykoproteine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

27. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie rekombinante Glykoproteine nach einem der Ansprüche 24 bis 26 umfasst.

28. Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass DNA-Moleküle gemäß Anspruch 7 zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus umfasst.

30. DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 28 oder 29 selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden.

31. Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 13 kloniert wurde, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.8 und 8.2 aufweist.

32. Präparation nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 aufweist.

WO 00/49153

- 48 -

PCT/AT00/00040

33. Verfahren zur Herstellung von verpflanzlichten Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codierte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird.

Ersatzseite

PARENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

18. April 2000

Date of mailing (day/month/year) 10 April 2000 (10.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference R 36247	
International application No. PCT/AT00/00040	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant ALTMANN, Friedrich	International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00) Priority date (day/month/year) 18 February 1999 (18.02.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
18 Febr 1999 (18.02.99)	A 270/99	AT	27 Marc 2000 (27.03.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Form PCT/IB/304 (July 1998)

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003219107

PATENT COOPERATION TREATY

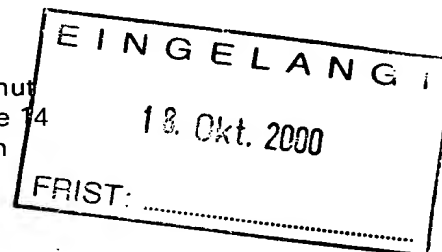
PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year)

06 October 2000 (06.10.00)

Applicant's or agent's file reference

R 36247

IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/AT00/00040

International filing date (day/month/year)

17 February 2000 (17.02.00)

Priority date (day/month/year)

18 February 1999 (18.02.99)

Applicant

ALTMANN, Friedrich

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

~~AP: GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW~~
~~EP: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE~~
 National: ~~AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US~~

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

~~EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM~~
~~OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG~~
 National: ~~AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW~~

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Kiwa Mpay *KMP*

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:
SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

E I N G E L A N G T

07. Sep. 2000

FRIST
IMPORTANT NOTICE

Date of mailing (day/month/year)
24 August 2000 (24.08.00)

Applicant's or agent's file reference
R-36247

International application No.
PCT/AT00/00040

International filing date (day/month/year)
17 February 2000 (17.02.00)

Priority date (day/month/year)
18 February 1999 (18.02.99)

Applicant
ALTMANN, Friedrich

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 24 August 2000 (24.08.00) under No. WO 00/49153

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference R 36247	International application No. PCT/AT00/00040
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Sonn, Pawloy, Weinzinger,
Pawloy & Alge
Riemérgasse 14
A - 1010 Wien
AUTRICHE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 12.06.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
R 36247

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT00/00040

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
17/02/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
18/02/1999

Anmelder
ALTMANN, Friedrich

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sinanovic, E

Tel. +31 70 340-2672



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 36247	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT00/00040	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 17/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 18/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/54		
Anmelder ALTMANN, Friedrich		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter Macchia, G Tel. Nr. +31 70 340 4078 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-42 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-33 eingegangen am 26/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/16-16/16 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

8, eingereicht mit Schreiben vom 18/05/2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

PCT/AT00/00040

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

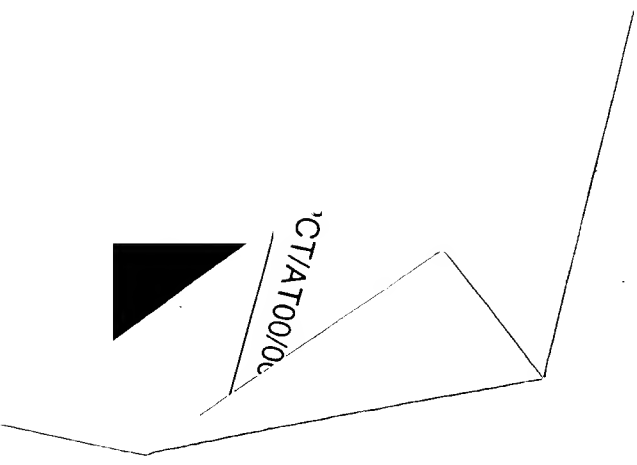
- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.



CT/AT00/00



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT00/00040

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23, 28-30
	Nein: Ansprüche	24-27, 31-33
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23, 28-30 teilweise
	Nein: Ansprüche	1-33 (1-23 und 28-30 teilweise)
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-33
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1). Die verschiedenen Erfindungen sind:

- a) Ansprüche 1-23, 28-33:
Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, verwandte Produkte und Verfahren;
- b) Ansprüche 24-27:
Rekombinante Glykoproteine und verwandte pharmazeutische Zusammensetzungen.

2.1). Aus den folgenden Gründen hängen diese Erfindungen nicht so zusammen, daß sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT): eine Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase gemäß einem der Ansprüche 31 und 32 ist bereits bekannt (siehe die Gründe für diesen Einwand). Das besondere technische Merkmal, das den Beitrag der ersten Erfindung zum Stand der Technik bestimmt, ist die Nukleinsäure, die für die obengenannte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert.

Weder dieses noch ein entsprechendes technisches Merkmal ist in den Ansprüchen 24-27 enthalten.

Die erforderliche Einheitlichkeit der Erfindung (Regel 13.1 PCT) ist damit insofern nicht mehr gegeben, als zwischen den Gegenständen der zwei obengenannten Erfindungen kein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT besteht, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmalen zum Ausdruck kommt.

2.2). Trotzdem wurde für obengenannte Erfindungen ein vollständiger Recherchenbericht erstellt. Da eine vollständige internationale Prüfung ohne übermäßigen Arbeitsaufwand durchgeführt werden kann, sieht die Internationale Prüfungsbehörde von einer Aufforderung zur Einschränkung oder zur Entrichtung zusätzlicher Gebühren ab.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1). Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: STAUDACHER E. ET AL.: 'Functional purification and characterization of a GDP-fucose: β -N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) α -1,3-fucosyltransferase from mung beans' GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 12, 1995, Seiten 780-786, XP002140246;
- D2: ALTMANN F.: 'More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?' GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 14, 1997, Seiten 643-646, XP002140795;
- D3: LEROUGE P. ET AL.: 'N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends' PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 38, 1998, Seiten 31-48, XP002140796.

2.1). Dokument D1 offenbart eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus Mungobohnen, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pI von ungefähr 8.5 aufweist (D1: Seite 783).

Dokument D1 offenbart auch ein Verfahren zur Herstellung von Mungobohnen-spezifischen Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß zu einem Substrat-Akzeptor Kohlenhydrat-Einheiten umfassend Peptide aus dem Rinderfibrin (GnGn) oder dem menschlichen IgG (GnGnF⁶), Fucose-Einheiten sowie eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, sodaß Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit gebunden wird (D1: Seiten 781-782).

2.2). Der Gegenstand der Ansprüche 31 und 32 ist daher nicht neu (Art. 33(2) PCT), weil ein Parameter (pI Wert) nicht ausreichend ist, um ein Produkt eindeutig vom Stand der Technik abzugrenzen (PCT Richtlinien III-4.7a).

Mit Rücksicht auf diese Gründe, ist der Gegenstand des Anspruchs 33 auch nicht neu (Art. 33(2) PCT), weil die kennzeichnenden technischen Merkmale keine

Unterscheidung zwischen dem Verfahren aus D1 und demjenigen aus Anspruch 33 zulassen.

Im übrigen wird der Anmelder darauf hingewiesen, daß die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus den Ansprüchen 31 und 32 (und diejenige, die in Anspruch 33 genannt ist) nicht schon dadurch neu wird, daß sie durch ein möglicherweise neues Verfahren hergestellt wird.

- 3.1). Das Dokument D2 offenbart ein rekombinantes Glykoprotein (menschliche Glukocerebrosidase) und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Glykoprotein die Glykane Man3GlcNAc2(Fuc) aufweist (D2: Seite 645). Diese Glykanstruktur ist dieselbe Struktur, die in Insektenglykoproteinen gefunden wird, und weist keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste auf (D2: Abbildung 2).

Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß ein Produkt (obengenanntes Glykoprotein) nicht schon dadurch neu wird, daß es durch ein möglicherweise neues Verfahren hergestellt wird, steht Dokument D2 dem Gegenstand der Ansprüche 24-27 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Art. 33(2) PCT).

- 3.2). Das Dokument D3 offenbart ein rekombinantes Glykoprotein (monoklonaler Antikörper Guy's 13 der Maus) und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Glykoprotein keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist (D3: Seite 44).

Daher steht Dokument D3 dem Gegenstand der Ansprüche 24 und 27 der vorliegenden Anmeldung neuheitsschädlich entgegen (Art. 33(2) PCT).

- 4.1). Das Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik für die erste Erfindung angesehen wird, offenbart eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase aus Mungobohnen, von der sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch unterscheidet, daß das DNA-Molekül, das für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert, offenbart wird.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist somit neu (Artikel 33(2) PCT).

- 4.2). Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, die Bereitstellung eines DNA-Moleküls, das für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kodiert.

- 4.3). Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung, insofern sie ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 betrifft, beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT), weil die Erhaltung eines DNA-Moleküls mit der Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1, nicht in naheliegender Weise aus dem Stand der Technik abzuleiten ist.
- 4.4). Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung, insofern sie ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen betrifft, beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT), weil die Erhaltung eines solchen DNA-Moleküls aus der Fucosyltransferase von D1 eine naheliegende Laboratoriumpraxis ist.
- 4.5). Die Ansprüche 2-7 sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit (Artikel 33 (2) PCT).
Die Ansprüche 2-7 (insofern sie sich auf ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 beziehen) erfüllen auch die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).
Mit Rücksicht auf die Gründe in der Abschnitt 4.4), erfüllen die Ansprüche 2-7 (insofern sie sich auf ein DNA-Molekül, das 70-80% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 umfasst oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen beziehen) nicht die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).
- 4.6). Mit Rücksicht auf die Gründe in den Abschnitten 4.1-4), sind die Produkte und Verfahren gemäß den Ansprüchen 8-23 und 28-30 der vorliegenden Anmeldung, die dem DNA-Molekül gemäß dem Anspruch 1 verwandt sind, auch neu (Artikel 33(2) PCT).
Sie beruhen auch auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) insofern sie sich auf ein DNA-Molekül mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 beziehen.
Sie beruhen nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) insofern sie sich auf ein DNA-Molekül, das zumindest 50% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 oder hybridisierende und degenerierte Sequenzen beziehen.

- 5). Die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands der Ansprüche 1-33 wird anerkannt (Artikel 33(4) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

- 1). Die folgende Bemerkungen werden bezüglich Artikel 6 PCT gemacht.
- 2). Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 5 kann nicht eindeutig identifiziert werden, weil die Hybridisierungs- und Waschbedingungen nicht angegeben werden.
" Der Wortlaut eines jeden Patentanspruchs ist so zu verstehen, daß sich für die einzelnen Wörter die Bedeutung und die Reichweite ergeben, die sie auf dem betreffenden Gebiet normalerweise haben, es sei denn, die Beschreibung verleiht den Wörtern in bestimmten Fällen durch ausdrückliche Definition oder auf andere Weise eine besondere Bedeutung " (PCT Richtlinien III-4.2).
In diesem Fall ist der Fachmann auf dem laufenden, daß der Ausdruck " stringente Bedingungen " nicht ausreichend ist, um den betreffenden Gegenstand eindeutig identifizieren zu können. Da der Ausdruck " stringent " keine Angabe darüber gibt, wie diese Bedingungen erhalten werden können.
Sogar die eventuell gebrauchten Ausdrücke " hohe/mäßige/niedrige stringente Bedingungen ", würde mißverstanden werden, und würden die Erfordernisse der PCT Richtlinien III-4.5 nicht erfüllen.
- 3). Der Gegenstand der Ansprüche 16 und 17 (Pflanzen/Pflanzenzellen bzw. Insekten/Insektenzellen), sowie der Ansprüche 24-27 (Glykoproteine), des Anspruchs 30 (DNA-Molekül, das für eine Fucosyltransferase kodiert), und der Ansprüche 31 und 32 (Fucosyltransferase), ist durch ein Verfahren zu ihrer Herstellung gekennzeichnet.
Ansprüche für Erzeugnisse, die durch ihr Herstellungsverfahren gekennzeichnet sind (sog. "Product- by- process- Ansprüche"), sind nur zulässig, wenn die Erzeugnisse als solche die Voraussetzungen für die Patentierbarkeit erfüllen und die Anmeldung keine anderen Angaben enthält, die es dem Anmelder ermöglichen würden, das Erzeugnis durch seine Zusammensetzung, seine Struktur oder sonstige nachprüfbare Parameter hinreichend zu kennzeichnen.

In diesem Fall gibt es die Möglichkeit, die Pflanzen/Pflanzenzellen und Insekten/Insektenzellen, sowie die Glykoproteine, das DNA-Molekül und die Fucosyltransferase durch ihre technischen Merkmale (der Vektor, der in diesen Zellen enthalten ist, beziehungsweise die Aminosäure- oder DNA Sequenz) zu kennzeichnen.

Obige Bemerkung gilt auch für Ansprüche 21-23 und 33.

WO 00/49153

- 43 -

EPO - DG 1

PCT/AT00/00040

26. 03. 2001

Patentansprüche:

(46)

1. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.

2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, codiert.

3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 aufweist.

4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare umfasst.

5. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, insbesondere zumindest 95%, Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist.

6. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Teilsequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst und eine Homologie von zumindest 80% zur SEQ ID NO: 1 sowie eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist.

WO 00/49153

- 44 -

PCT/AT00/00040

7. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.

8. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst.

9. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst.

10. DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, dadurch gekennzeichnet, dass es zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird.

11. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 umfasst.

12. Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotylzellen, isoliert wird, mit der nach Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird.

13. Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einen Vektor kloniert wird, der anschließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren.

WO 00/49153

- 45 -

PCT/AT00/00040

14. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest einer der Vektoren gemäß Anspruch 8, 9 oder 11 bzw. ein Vektor umfassend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst, in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird.

15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, dadurch gekennzeichnet, dass das DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst, in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird.

16. Rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 hergestellt sind und dass ihre endogene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

17. Rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 hergestellt sind und dass ihre endogene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

18. Peptidnukleinsäure(PNA)-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon ist.

19. Peptidnukleinsäure(PNA)-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon entspricht.

WO 00/49153

- 46 -

PCT/AT00/00040

20. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass PNA-Moleküle gemäß Anspruch 18 oder 19 in die Zellen eingeschleust werden.

21. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.

22. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.

23. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 16 oder 17 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 20 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.

24. Rekombinante Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 21 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykoproteine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

25. Rekombinante humane Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykopro-

WO 00/49153

- 47 -

PCT/AT00/00040

teine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

26. Rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 23 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass die Glykoproteine unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

27. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie rekombinante Glykoproteine nach einem der Ansprüche 24 bis 26 umfasst.

28. Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass DNA-Moleküle gemäß Anspruch 7 zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus umfasst.

30. DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 28 oder 29 selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden.

31. Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 13 kloniert wurde, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.8 und 8.2 aufweist.

32. Präparation nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 aufweist.

WO 00/49153

- 48 -

PCT/AT00/00040

33. Verfahren zur Herstellung von verpflanzlichten Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codierte GlcNAC- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAC- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird.

Ersatzseite

ART 34 AMDT

09/913858
518 Rec'd T/PTO 20 AUG 2001

REPLACEMENT SHEET

- 4 0 -

PCT/AT00/00040

WHAT WE CLAIM IS:

1. A DNA molecule, characterized in that it comprises a sequence according to SEQ ID NO 1 with an open reading frame from base pair 211 to base pair 1740, or is at least 50% homologous with the above sequence, or hybridizes with the above sequence under stringent conditions, or comprises a sequence which has degenerated to the above DNA sequence due to the genetic code, with the sequence coding for a plant protein having fucosyl transferase activity or being complementary thereto.

2. A DNA molecule according to claim 1, characterized in that it codes for a protein having GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase activity, particularly core- α 1,3-fucosyl transferase activity.

3. A DNA molecule according to claims 1 or 2, characterized in that it is at least 70-80%, particularly preferably at least 95% homologous with the sequence according to SEQ ID NO 1.

4. A DNA molecule according to any one of claims 1 to 3, characterized in that it comprises 2150 to 2250, particularly 2198 base pairs.

5. A DNA molecule, characterized in that it comprises a sequence according to SEQ ID NO 3, or comprises a sequence which is at least 85%, particularly at least 95% homologous with the above sequence or hybridizes with the above sequence under stringent conditions or has degenerated to the above DNA sequence due to the genetic code.

6. A DNA molecule, characterized in that it comprises a partial sequence of a DNA molecule according to any one of claims 1 to 4 and is at least 80% homologous with SEQ ID NO: 1 and has a size of 20 to 200, preferably 30 to 50 base pairs.

7. A DNA molecule according to any one of claims 1 to 6, characterized in that it is covalently associated with a detectable marker substance.

8. A biologically functional vector, characterized in that it comprises a DNA molecule according to any one of claims 1 to 7 or parts thereof of different length having at least 20 base pairs.

9. A biologically functional vector, characterized in that it comprises a DNA molecule according to any one of claims 1 to 7 or parts thereof of different length being inversely orientated with respect to the promotor.

10. A DNA molecule coding for a ribozyme, characterized in that it has two sequence sections, each of which has a length of at least 10 to 15 base pairs and which are complementary to the sequence sections of a DNA molecule according to any one of claims 1 to 7 so that said ribozyme complexes and cuts the mRNA transcribed by a natural GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase DNA molecule.

11. A biologically functional vector, characterized in that it comprises a DNA molecule according to claim 10.

12. A method of preparing a cDNA comprising a DNA molecule according to any one of claims 1 to 5, characterized in that RNA is isolated from insect or plant cells, particularly from hypocotylous cells, and with said RNA a reverse transcription is effected after the addition of a reverse transcriptase and primers.

13. A method of cloning a GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase, characterized in that a DNA molecule according to any one of claims 1 to 5 is cloned into a vector subsequently transfected into a host cell or a host, with cell lines being obtained by means of selection and amplification of transfected host cells, which cell lines express the active GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase.

14. A method of preparing recombinant host cells, particularly plant or insect cells, or plants or insects, respectively, wherein the production of GlcNAc- α -1,3-fucosyl transferase is suppressed or completely stopped, characterized in that at least one of the vectors according to claims 8, 9 or 11 and a vector comprising a DNA molecule according to any one of claims 1 to 7, whereby said DNA sequence comprises a deletion, insertion and/or substitution mutation, respectively, is inserted into said host cell, or plant or insect, respectively.

15. A method of preparing recombinant host cells, particularly plant or insect cells, or plants or insects, respectively, characterized in that the DNA molecule according to any one of claims 1 to 7, whereby said DNA sequence comprises a deletion, insertion and/or substitution mutation, is inserted into the genome of said host cell, or plant or insect, respectively, at the position of the non-mutated, homologous sequence.

16. Recombinant plants or plant cells, characterized in that they are prepared according to a method according to claims 14 or 15 and that their GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase production is

suppressed or completely stopped.

17. Recombinant insects or insect cells, characterized in that they are prepared according to a method according to claims 14 or 15 and that their GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase production is suppressed or completely stopped.

18. A PNA (peptide nucleic acid) molecule, characterized in that it comprises a base sequence complementary to the sequence of a DNA molecule according to any one of claims 1 to 6 and partial sequences thereof.

19. A PNA molecule, characterized in that it comprises a base sequence corresponding to the sequence of a DNA molecule according to any one of claims 1 to 6 and partial sequences thereof.

20. A method of producing plants or insects, or cells, respectively, particularly plant or insect cells having blocked expression of GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase at the transcription or translation level, characterized in that PNA molecules according to claims 18 or 19 are inserted into the cells.

21. A method of producing recombinant glycoproteins, characterized in that the system according to claims 16 or 17 or plants or insects, or cells, respectively, which are prepared according to a method according to claim 20, is (are) transfected with the gene that expresses the glycoprotein so that the recombinant glycoproteins are expressed.

22. A method of producing recombinant human glycoproteins, characterized in that the system according to claims 16 or 17 or plants or insects, or cells, respectively, which are prepared according to a method according to claim 20, is (are) transfected with the gene that expresses the glycoprotein so that the recombinant glycoproteins are expressed.

23. A method of producing recombinant human glycoproteins for medical use, characterized in that the system according to claims 16 or 17 or plants or insects, or cells, respectively, which are prepared according to a method according to claim 20, is (are) transfected with the gene that expresses the glycoprotein so that the recombinant glycoproteins are expressed.

24. Recombinant glycoproteins, characterized in that they are prepared according to the method according to claim 21 in plant or insect systems and that their peptide sequence has less than 50%, particularly less than 20%, particularly preferably 0%

of α 1,3-bound fucose residues present in proteins expressed in non-fucosyl transferase reduced plant or insect systems.

25. Recombinant human glycoproteins, characterized in that they are prepared according to the method according to claim 22 in plant or insect systems and that their peptide sequence has less than 50%, particularly less than 20%, particularly preferably 0% of α 1,3-bound fucose residues present in proteins expressed in non-fucosyl transferase reduced plant or insect systems.

26. Recombinant human glycoproteins for medical use, characterized in that they are prepared according to the method according to claim 23 in plant or insect systems and that their peptide sequence has less than 50%, particularly less than 20%, particularly preferably 0% of α 1,3-bound fucose residues present in proteins expressed in non-fucosyl transferase reduced plant or insect systems.

27. A pharmaceutical composition, characterized in that it comprises recombinant glycoproteins according to any one of claims 24 to 26.

28. A method of selecting DNA molecules coding for a GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase, in a sample, characterized in that DNA molecules according to claim 7 are added to said sample, which molecules bind to the DNA molecules coding for a GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase.

29. A method according to claim 28, characterized in that said sample comprises genomic DNA of a plant or insect organism.

30. DNA molecules coding for a GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase, characterized in that they are selected according to the method according to claims 28 or 29 and are subsequently isolated from the sample.

31. A preparation of GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase cloned according to a method according to claim 13, characterized in that it has isoforms having pI values of between 6.8 and 8.2.

32. A preparation according to claim 31, characterized in that it has isoforms having pI values of 6.8, 7.1 and 7.6.

33. A method of preparing plantified carbohydrate units of human and other vertebrate glycoproteins, characterized in that to a sample comprising a carbohydrate unit or a glycoprotein, respectively, are added fucose units and GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase coded by a DNA molecule according to any one of claims 1

to 7 so that fucose is bound to said carbohydrate unit or said glycoprotein, respectively, at the α 1,3-position by said GlcNAc- α 1,3-fucosyl transferase.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/54, 9/10, 15/11, 9/00, 5/10, C12P 21/00, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49153 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00040 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 2000 (17.02.00) (30) Prioritätsdaten: A 270/99 18. Februar 1999 (18.02.99) AT (71)(72) Anmelder und Erfinder: ALTMANN, Friedrich [AT/AT]; Institut für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien (AT). (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: FUCOSYL TRANSFERASE GENE (54) Bezeichnung: FUCOSYLTRANSFERASE-GEN (57) Abstract The invention relates to a DNA molecule which comprises a sequence according to SEQ ID No: 1 with an open reading frame of base pair 211 to base pair 1740 or which exhibits at least 50 % homology to the above-mentioned sequence, or which is hybridized with the above-mentioned sequence under stringent conditions, or which comprises a sequence that is degenerated to the above-mentioned DNA sequence due to the genetic code. The sequence codes for a vegetable protein comprising a fucosyl transferase activity or is complementary thereto. (57) Zusammenfassung Es wird ein DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50 % Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Fucosyltransferase-Gen

Die Erfindung betrifft Polynukleotide, die für eine Fucosyltransferase codieren. Weiters betrifft die Erfindung Teilsequenzen dieser Polynukleotide sowie Vektoren mit diesen Polynukleotiden, rekombinante Wirtszellen, Pflanzen und Insekten, die mit den Polynukleotiden bzw. davon abstammender DNA transfektiert sind sowie die in diesen Systemen produzierten Glykoproteine.

Glykoproteine weisen eine Vielfalt und Komplexität von Kohlenhydrat-Einheiten auf, wobei die Zusammensetzung und Anordnung der Kohlenhydrate für unterschiedliche Organismen charakteristisch ist. Die Oligosaccharid-Einheiten der Glykoproteine haben eine Reihe von Aufgaben, so sind sie z.B. wichtig in der Stoffwechselregulation, sie sind an der Vermittlung von Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt, sie bestimmen die Zirkulationszeiten von Proteinen im Blutkreislauf und sie sind ausschlaggebend für die Erkennung von Epitopen in Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Die Glykosylierung von Glykoproteinen beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER), wo die Oligosaccharide entweder durch N-glykosidische Bindungen an Asparagin-Seitenketten oder durch O-glykosidische Bindungen an Serin- oder Threonin-Seitenketten gebunden werden. Die N-gebundenen Oligosaccharide enthalten ein gemeinsames Core aus einer Pentasaccharid-Einheit, die aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten besteht. Zur weiteren Modifikation der Kohlenhydrat-Einheiten werden die Proteine vom ER zum Golgi-Komplex transportiert. Die Struktur der N-gebundenen Oligosaccharideinheiten von Glykoproteinen wird von ihrer Konformation und der Zusammensetzung der Glykosyltransferasen der Golgi-Kompartimente bestimmt, in denen sie prozessiert werden.

Es wurde gezeigt, dass im Golgi-Komplex einiger Pflanzen- und Insektenzellen die Core-Pentasaccharideinheit durch Xylose und α 1,3-gebundene Fucose substituiert wird (P. Lerouge et al. 1998 Plant Mol. Biol. 38, 31-48; Rayon et al. 1998 L. Exp. Bot. 49, 1463-1472). Das entstehende Heptasaccharid "MMXF³" stellt den Hauptoligosaccharid Typ in Pflanzen dar (Kurosaka et al. 1991 J.Biol.Chem., 266, 4168-4172). So weisen z.B. die Meerrettich Peroxidase, Karotten β -Fructosidase und Erythrina

crisagalli Lectin als auch die Honigbienengift Phospholipase A2 oder die neuronalen Membran Glykoproteine aus Insekten Embryonen α 1,3-Fucosereste, die an das Glykancore gebunden sind, auf. Diese Strukturen werden auch komplexe N-Glykane bzw. Mannose defiziente oder trunkierte N-Glykane genannt. Die α -Mannosylreste können weiters durch GlcNAc ersetzt werden, an die Galaktose und Fucose gebunden sind, so dass eine Struktur hergestellt wird, die dem humanen Lewis a Epitop entspricht (Melo et al. 1997, FEBS Lett. 415, 186-191; Fitchette-Laine et al. 1997 Plant J. 12, 1411-1417).

Weder die Xylose noch die α 1,3-gebundene Fucose kommen in Säugerglykoproteinen vor. Es stellte sich heraus, dass die Core- α 1,3-Fucose eine wichtige Rolle in der Epitoperkennung von Antikörpern spielt, die gegen pflanzliche und Insekten-N-gebundene Oligosaccharide gerichtet sind (I.B.H. Wilson et al., Glycobiology Vol. 8, Nr. 7, S. 651-661, 1998) und dadurch Immunreaktionen im menschlichen oder tierischen Körper gegen diese Oligosaccharide auslösen. Der α 1,3-Fucoserest scheint weiters eine der Hauptursachen für die weit verbreitete allergische Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen pflanzlichen und Insekten-Allergenen zu sein (Tretter et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 1993; 102:259-266) und wird auch "kreuzreaktive Kohlenhydrat Determinante" (CCD) genannt. Bei einer Studie von Epitopen von Tomaten und Graspollen wurden ebenfalls α 1,3-gebundene Fucose-resten als gemeinsame Determinante festgestellt, was der Grund für das häufige gemeinsame Auftreten von Tomaten- und Graspollenallergien in Patienten zu sein scheint (Petersen et al. 1996, J. Allergy Clin. Immunol., Vol 98, 4; 805-814). Die CCDs verschleiern weiters durch das häufige Auftreten von immunologischen Kreuzreaktionen Allergie-Diagnosen.

Diese immunologischen Reaktionen, die von pflanzlichen Proteinen im menschlichen Körper ausgelöst werden, sind das Hauptproblem bei der medizinischen Verwendung von in Pflanzen produzierten, rekombinanten menschlichen Proteinen. Um dieses Problem zu umgehen, müsste die α 1,3 Core-Fucosylierung verhindert werden. Es konnte in einer Studien gezeigt werden, dass Oligosaccharide, die anstelle einer L-Fucose (6-Deoxy-L-Galaktose) eine L-Galaktose aufweisen, dennoch voll biologisch aktiv sind (E. Zablackis et al. 1996, Science, Vol 272). Gemäß einer ande-

ren Studie wurde eine Mutante der Pflanze *Arabidopsis thaliana* isoliert, dem die N-Acetyl-Glucosaminyl-Transferase I fehlt, das erste Enzym in der Biosynthese von komplexen Glykanen. Die Biosynthese der komplexen Glykoproteine in dieser Mutante ist damit gestört. Dennoch sind diese mutierten Pflanzen in der Lage, sich unter bestimmten Bedingungen normal zu entwickeln (A. Schaewen et al. 1993, Plant Physiol. 102; 1109-1118).

Um die Bindung der Core- α 1,3 Fucose in einem Oligosaccharid gezielt zu unterbinden, ohne auch in andere Glykosylierungsschritte einzugreifen, müsste nur das Enzym ausgeschaltet werden, das direkt für diese spezifische Glykosylierung verantwortlich ist, nämlich die Core- α 1,3-Fucosyltransferase. Sie wurde erstmals aus Mungo Bohnen isoliert und charakterisiert, wobei festgestellt wurde, dass die Aktivität dieses Enzyms abhängig von der Gegenwart von nichtreduzierenden GlcNAc-Enden ist (Staudacher et al., 1995, Glycoconjugate J. 12, 780-786). Diese Transferase, die nur in Pflanzen und Insekten, nicht aber im Menschen oder anderen Wirbeltieren vorkommt, müsste gezielt inaktiviert oder unterdrückt werden, so dass menschliche Proteine, die in Pflanzen oder pflanzlichen Zellen bzw. auch Insekten oder -zellen hergestellt werden, diese Immunreaktionen auslösende Epitop nicht mehr wie bisher aufweisen.

Die Schrift von John M. Burke "Clearing the way for ribozymes" (Nature Biotechnology 15:414-415; 1997) betrifft die generelle Funktionsweise von Ribozymen.

Die Schrift von Pooga et al "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo" (Nature Biotechnology 16:857-861; 1998) betrifft PNA-Moleküle allgemein und spezifisch ein PNA-Molekül, das komplementär zur humanen Galaninrezeptortyp 1 mRNA ist.

Die US 5 272 066 A betrifft ein Verfahren zur Veränderung von eukaryotischen und prokaryotischen Proteinen, um ihre in vivo-Zirkulation zu verlängern. Dabei werden die gebundenen Oligosaccharide mit Hilfe von verschiedenen Enzymen, darunter auch die GlcNAc- α 1 \rightarrow 3(4)-Fucosyltransferase verändert.

Die EP 0 643 132 A1 betrifft die Klonierung einer α 1,3-Fucosyltransferase, die aus humanen Zellen (THP-1) isoliert wird. Die in dieser Schrift beschriebenen Kohlenwasserstoffketten entsprechen den menschlichen Sialyl Lewis x- und Sialyl Lewis a-

Oligosacchariden. Die Spezifität des Enzyms aus humanen Zellen ist eine ganz andere als die Fucosyltransferase aus pflanzlichen Zellen.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, das Gen, das für eine pflanzliche Fucosyltransferase codiert, zu klonieren und zu sequenzieren, Vektoren umfassend dieses Gen, DNA-Stücke davon oder geänderte oder davon abgeleitete DNA herzustellen, Pflanzen und Insekten sowie Zellen davon mit einem dieser Vektoren zu transfektieren, Glykoproteine herzustellen, die die normalerweise vorkommende $\alpha 1,3$ -Core Fucose nicht umfassen, sowie entsprechende Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein DNA-Molekül, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 (in dieser Schrift wurde der IUPAC-Code verwendet, wobei "N" für Inosin steht) mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.

Diese Sequenz, die zuvor noch nie beschrieben wurde, eignet sich ausgezeichnet für jegliche Experimente, Analysen und Herstellungsverfahren etc., die sich auf die pflanzliche Fucosyltransferase-Aktivität beziehen. Dabei ist sowohl die DNA-Sequenz als auch das von dieser Sequenz codierte Protein von Interesse, wobei aber insbesondere die DNA-Sequenz für die Unterbindung der Fucosyltransferase-Aktivität herangezogen wird.

Der offene Leserahmen der Sequenz mit der SEQ ID No: 1 codiert für ein Protein mit 510 Aminosäuren und mit einem theoretischen Molekulargewicht von 56,8 kDa, wobei im Bereich zwischen Asn36 und Gly54 vermutlich ein transmembranes Stück vorliegt. Der errechnete pI-Wert des codierten Proteins der Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 beträgt 7,51.

Die Aktivität der pflanzlichen Fucosyltransferase wird durch ein Verfahren nachgewiesen und gemessen, wobei die Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend markierte Fucose und einen an einen Träger, z.B. Sepharose, gebundenen Akzeptor (z.B. ein Glykoprotein) zugesetzt wird. Nach der Reaktionszeit wird die

Probe gewaschen und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird dabei als positiv angesehen, wenn die Aktivitätsmessung zumindest um 10 bis 20%, insbesondere zumindest um 30 bis 50% höher liegt als die Aktivitätsmessung der Negativkontrolle. Die Struktur des Glykoproteins kann zusätzlich mittels HPLC verifiziert werden. Solche Protokolle sind Stand der Technik (Staudacher et al. 1998, Anal. Biochem. 246, 96-101; Staudacher et al. 1991, Eur.J. Biochem. 199, 745-751).

Beispielsweise wird Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend radioaktiv markierter Fucose und einen Akzeptor, z.B. GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, zugesetzt. Nach Reaktionszeit wird die Probe durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Aus der Differenz der gemessenen Radioaktivität der Probe mit Akzeptor und der einer Negativkontrolle ohne Akzeptor kann die Aktivität errechnet werden. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird bereits als positiv gewertet, wenn die gemessene Radioaktivität zumindest um 30-40% höher liegt als die gemessene Radioaktivität der Negativprobe.

Die Paarung von zwei DNA-Molekülen kann durch die Wahl der Temperatur und Ionenstärke der Probe verändert werden. Unter stringenten Bedingungen, werden erfindungsgemäß Bedingungen verstanden, die eine exakte, stringente, Bindung ermöglichen. Z.B. werden die DNA-Moleküle in 7% Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), 0,5M NaPO₄ pH 7,0; 1mM EDTA bei 50°C hybridisiert und mit 1% SDS bei 42°C gewaschen.

Ob Sequenzen eine zumindest 50% Homologie zur SEQ ID No: 1 aufweisen, kann z.B. mit dem Programm FastDB der EMBL oder SWISSPROT Datenbank ermittelt werden.

Bevorzugterweise codiert die Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität. Wie oben bereits beschrieben, kommt die Core- α 1,3-Fucosyltransferase in Pflanzen und Insekten, nicht aber im menschlichen Organismus vor, so dass insbesondere diese DNA-Sequenz geeignet ist, in Fucosyltransferase-spezifischen Analysen und Experimenten sowie Produktionsverfahren verwendet zu werden. Unter einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase wird insbeson-

dere die GDP-L-Fuc:Asn-gebundene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase verstanden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist mit der Bezeichnung α 1,3-Fucosyl-transferase in der Regel insbesondere die Core- α 1,3-Fucosyltransferase gemeint. Zur oben beschriebenen Aktivitätsmessung dienen dabei insbesondere Akzeptoren mit einem nicht reduzierenden GlcNAc-Ende. Solche Akzeptoren sind z.B. GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6GlcNAc β 1-Asn und GlcNAc β 1-2Man α 1-3[Man α 1-3(Man α 1-6)Man α 1-6]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn. Ob die Fucose gebunden ist, kann weiters durch Messen der Unempfindlichkeit gegenüber der N-Glykosidase F festgestellt werden, was mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann.

Bevorzugterweise weist das erfindungsgemäße DNA-Molekül zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 auf. Diese Sequenz codiert für eine besonders aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase. Da die DNA-Sequenz je nach Pflanze bzw. Insekt mehr oder weniger verändert sein kann, weist eine Sequenz, die z.B. 70% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 aufweist, ebenfalls eine Fucosyltransferase-Aktivität auf, die ausreicht, um für Analysen, Experimente oder Herstellungsverfahren wie oben beschrieben verwendet zu werden.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform umfasst das DNA-Molekül 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare. Dieses DNA-Molekül weist 100 bis 300, vorzugsweise 210, Basenpaare stromaufwärts vor dem Startcodon auf sowie 350 bis 440, insbesondere 458, Basenpaare stromabwärts nach dem Stopcodon des offenen Leserahmens auf, wobei das Ende des DNA-Moleküls vorzugsweise einen 3'-Poly(A)-Schwanz umfasst. Auf diese Weise ist eine einwandfreie Regulation auf dem Niveau der Translation gesichert, und es wird ein DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, das besonders effizient und problemlos für eine aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiters ein DNA-Molekül, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, besonders bevorzugt zumindest 95%, insbesondere zumindest 99%, Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der

oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA Sequenz degeneriert ist. Die Homologie wird vorzugsweise mit einem Programm bestimmt, das Insertionen und Deletionen erkennt und diese nicht in der Homologie-Berechnung berücksichtigt. Diese Nukleotidsequenz codiert für ein konserviertes Peptid-Motiv, d.h. dass die Mehrheit der aktiven und funktionierenden GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen die dadurch codierte Aminosäuresequenz umfasst. Die Sequenz kann dabei sowohl die gleiche Größe wie die Sequenz gemäß der SEQ ID No: 3 aufweisen, oder aber selbstverständlich auch größer sein. Diese Sequenz weist eine geringere Länge auf als die Sequenz, die für das gesamte Protein codiert, und ist somit weniger anfällig für Rekombinationen, Deletionen oder andere Mutationen. Aufgrund des konservierten Motivs und ihrer erhöhten Stabilität eignet sich diese Sequenz besonders gut für Sequenzerkennungstests.

Die SEQ ID No: 3 weist folgende Sequenz auf:

5'-gaagccctgaagcactacaaatttagcttagcggttgaaaattcgaatgaggaag
attatgtaactgaaaaattcttccaatcccttggttgctggaactgtccct -3'

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein DNA-Molekül, das eine Teilsequenz eines der oben genannten DNA-Moleküle umfasst und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist. Das DNA-Molekül kann beispielsweise dazu eingesetzt werden, als Sonde an komplementäre Sequenzen von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen zu binden, so dass diese aus einer Probe selektiert werden können. Auf diese Weise können weitere GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen aus den verschiedensten Pflanzen und Insekten selektiert, isoliert und charakterisiert werden. Es können jede beliebige oder auch mehrere verschiedene Teilsequenzen verwendet werden, insbesondere ein Teil des oben schon beschriebenen konservierten Motivs.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn eines der oben genannten DNA-Moleküle kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist. Als Markierungssubstanz kommt jeder gebräuchliche Marker in Frage, so z.B. fluoreszierende, luminiszierende, radioaktive Marker, nicht-isotope Markierungen, wie Biotin, etc. Dadurch werden Reagenzien bereitgestellt, die für den Nachweis, die Selektion und Quantifizierung von entsprechenden DNA-Molekülen in festen Gewebeproben (z.B. von Pflanzen)

oder auch in Flüssigkeitsproben durch Hybridisierungsverfahren nützlich sind.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der oben genannten DNA-Moleküle oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst. Zur Transfektion in Wirtszellen ist ein eigenständiger, vermehrungsfähiger Vektor notwendig, wobei je nach Wirtszelle, Transfektionsmechanismus, Aufgabe und Größe des DNA-Moleküls ein passender Vektor verwendet werden kann. Da eine große Zahl an verschiedenen Vektoren bekannt ist, würde eine Aufzählung den Rahmen der Anmeldung sprengen, so dass hier darauf verzichtet wird, insbesondere, da die Vektoren dem Fachmann bestens bekannt sind (bezüglich Vektoren sowie allen in dieser Schrift verwendeten Techniken und Begriffe, die dem Fachmann bekannt sind, siehe auch Sambrook Maniatis). Idealerweise weist der Vektor eine geringe Molekülmasse auf und sollte selektierbare Gene aufweisen, um in einer Zelle zu einem leicht erkennbaren Phänotyp zu führen, so dass eine einfache Selektion von vektorhaltigen und vektorfreien Wirtszellen möglich ist. Um eine hohe Ausbeute an DNA und entsprechenden Genprodukten zu erhalten, sollte der Vektor einen starken Promotor, sowie einen Enhancer, Genamplifikationssignale und Regulatorsequenzen aufweisen. Für eine autonome Replikation des Vektors ist weiters ein Replikationsursprung wichtig. Polyadenylierungsstellen sind für eine korrekte Prozessierung der mRNA und Spleißsignale für die von RNA-Transcripten verantwortlich. Werden Phagen, Viren oder Viruspartikel als Vektoren verwendet, steuern Verpackungssignale die Verpackung der Vektor-DNA. Z.B. sind für die Transkription in Pflanzen Ti-Plasmide geeignet und für die Transkription in Insektenzellen Baculoviren, bzw. in Insekten Transposons, wie das P Element.

Wird der oben beschriebene erfindungsgemäße Vektor in eine Pflanze oder Pflanzenzelle eingeschleust, so wird eine posttranskriptionelle Unterdrückung der Genexpression des endogenen $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase-Gens durch Transkription eines zu diesem homologen Transgens oder Teilen davon in Sense-Orientierung erreicht. Für diese Sense-Technik wird weiters auf die Schriften Baulcombe 1996, Plant.Mol.Biol.. 9:373-382 und Brigneti et al. 1998, EMBO J. 17:6739-6746 verwiesen. Diese Strategie des "Gen-

Silencing" stellt eine wirkungsvolle Möglichkeit dar, die Expression des $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase-Gens zu unterdrücken, s. auch Waterhouse et al. 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:13959-13964. —

Weiters betrifft die Erfindung einen biologisch funktionellen Vektor, der ein DNA-Molekül gemäß einem der oben beschriebenen Ausführungsformen oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst. Wird dieser Vektor in eine Wirtszelle transfektiert, wird eine "Antisense-mRNA" abgelesen, die komplementär zur mRNA der GlcNAc $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase ist und diese komplexiert. Diese Bindung behindert entweder die korrekte Prozessierung, den Transport, die Stabilität, oder durch Verhinderung der Ribosomenanlagerung die Translation und damit die normale Genexpression der GlcNAc $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase.

Obwohl die gesamte Sequenz des DNA-Moleküls in den Vektor eingebaut werden könnte, können Teilsequenzen davon aufgrund der geringeren Größe für bestimmte Zwecke vorteilhafter sein. Wichtig ist z.B. beim Antisense-Aspekt, dass das DNA-Molekül groß genug ist, um eine ausreichend große Antisense-mRNA zu bilden, die an die Transferase-mRNA bindet. Beispielsweise umfasst ein geeignetes Antisense-RNA-Molekül 50 bis 200 Nukleotide, da viele der bekannten natürlich vorkommenden Antisense-RNA-Molekülen etwa 100 Nukleotide umfassen.

Für eine besonders effektive Inhibierung der Expression einer aktiven $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase ist eine Kombination der Sense-Technik und Antisense-Technik geeignet (Waterhouse et al. 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:13959-13964).

Vorteilhafterweise werden schnell hybridisierende RNA-Moleküle eingesetzt. Die Effizienz von Antisense-RNA-Molekülen, die eine Größe von über 50 Nukleotiden aufweisen, hängt von der Anlagerungskinetik in vitro ab. So zeigen z.B. schnell anlagernde Antisense-RNA-Moleküle eine stärkere Inhibition der Proteinexpression als langsam hybridisierende RNA-Moleküle (Wagner et al. 1994, Annu. Rev. Microbiol., 48:713-742; Rittner et al. 1993, Nucl. Acids Res, 21:1381-1387). Solche schnell hybridisierenden Antisense-RNA-Moleküle weisen insbesondere eine große Anzahl von externen Basen (freie Enden und Verbindungssequenzen), eine große Anzahl von strukturellen Subdomänen (Komponen-

ten), sowie einen geringen Grad an Schleifen (Patzel et al. 1998; Nature Biotechnology, 16; 64-68) auf. Die hypothetischen Sekundärstrukturen des Antisense-RNA-Moleküls können z.B. mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt werden, gemäß dem eine geeignete Antisense-RNA DNA-Sequenz ausgesucht wird.

Es können unterschiedliche Sequenzregionen des DNA-Moleküls in den Vektor eingebaut werden. Eine Möglichkeit besteht z.B. darin, nur den Teil, der für die Ribosomenanlagerung verantwortlich ist, in den Vektor einzubauen. Eine Blockierung in diesem Bereich der mRNA reicht aus, um die gesamte Translation zu stoppen. Eine besonders hohe Effizienz der Antisense-Moleküle ergibt sich auch für die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des Gens.

Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße DNA-Molekül eine Sequenz auf, die eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst. Die Anzahl der mutierten Nukleotide ist dabei variabel und reicht von einem einzigen bis zu mehreren deletierten, inserierten oder substituierten Nukleotiden. Es ist auch möglich, dass durch die Mutation der Leserahmen verschoben ist. Wichtig bei einem derartigen "Knockout-Gen" ist lediglich, dass die Expression einer GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase gestört ist und die Bildung eines aktiven, funktionellen Enzyms verhindert wird. Dabei ist die Stelle der Mutation variabel, solange die Exprimierung eines enzymatisch aktiven Proteins unterbunden ist. Vorzugsweise ist die Mutation im katalytischen Bereich des Enzyms, der sich im C-terminalen Bereich befindet. Die Verfahren zum Einführen von Mutationen in DNA-Sequenzen sind dem Fachmann bestens bekannt, so dass hier darauf verzichtet wird, näher auf die verschiedenen Möglichkeiten der Mutagenesen einzugehen. Es können sowohl zufällige Mutagenesen aber auch insbesondere zielgerichtete Mutagenesen, z.B. die site-directed-mutagenesis, die oligonukleotidgesteuerte Mutagenese oder Mutagenesen mit Hilfe von Restriktionsenzymen hier zur Anwendung kommen.

Die Erfindung stellt weiters ein DNA-Molekül zur Verfügung, das für ein Ribozym codiert, welches zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls wie oben beschrieben komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird. Das Ribozym

erkennt die mRNA der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase durch komplementäre Basenpaarung mit der mRNA. Anschließend schneidet und zerstört das Ribozym die RNA in einer sequenzspezifischen Art, bevor das Enzym translatiert wird. Nach Dissoziation vom geschnittenen Substrat, hybridisiert das Ribozym wiederholt mit RNA-Molekülen und wirkt als spezifische Endonuklease. Generell können Ribozyme spezifisch zur Inaktivierung einer bestimmten mRNA hergestellt werden, selbst wenn nicht die gesamte DNA-Sequenz, die für das Protein codiert, bekannt ist. Ribozyme sind besonders dann effizient, wenn die Ribosomen langsam an der mRNA entlang gleiten. In diesem Fall ist es für das Ribozym leichter, eine Ribosomen-freie Stelle an der mRNA zu finden. Aus diesem Grund sind langsame Ribosomen-Mutante als System für Ribozyme ebenfalls geeignet (J.Burke, 1997, Nature Biotechnology; 15, 414-415). Dieses DNA-Molekül eignet sich besonders gut für die Unterdrückung bzw. Unterbindung der Expressierung einer pflanzlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase.

Eine Möglichkeit besteht auch darin, eine abgewandelte Form eines Ribozyms einzusetzen, nämlich ein Minizym. Insbesondere für das Schneiden von größeren mRNA-Molekülen sind Minizyme effizient. Ein Minizym ist ein Hammerkopf-Ribozym, das anstelle der Stem/Loop II einen kurzen Oligonukleotid-Linker aufweist. Besonders effizient sind Dimer-Minizyme (Kuwabara et al. 1998, Nature Biotechnology, 16; 961-965).

Demnach betrifft die Erfindung ebenfalls einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der beiden zuletztgenannten DNA-Moleküle (Mutations oder Ribozym-DNA-Molekül) umfasst. Hierbei gilt das oben bezüglich Vektoren bereits Beschriebene. Ein solcher Vektor kann z.B. in einen Mikroorganismus eingeschleust und für die Herstellung von hohen Konzentrationen der oben beschriebenen DNA-Moleküle verwendet werden. Weiters ist ein solcher Vektor besonders gut für die Einschleusung des spezifischen DNA-Moleküls in einen pflanzlichen oder Insekten-Organismus geeignet, um die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion in diesem Organismus einzuschränken oder völlig zu unterbinden.

Gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, wobei RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotyl-Zellen, isoliert wird, mit der nach

Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird. Die einzelnen Schritte dieses Verfahrens werden nach Protokollen wie an sich bekannt durchgeführt. Für die reverse Transkription besteht einerseits die Möglichkeit, mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern die cDNA der gesamten mRNA herzustellen und erst anschließend mit ausgewählten Primern eine PCR durchzuführen, um DNA-Moleküle umfassend das GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Gen herzustellen. Andererseits können die ausgewählten Primer direkt für die reverse Transkription eingesetzt werden, um eine kurze, spezifische cDNA zu erhalten. Die geeigneten Primer können z.B. synthetisch nach Vorlage von cDNA-Sequenzen der Transferase hergestellt werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens können sehr rasch und einfach, mit geringer Fehlerquote, große Mengen an erfindungsgemäßen cDNA-Molekülen hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass das erfindungsgemäße DNA-Molekül in einen Vektor kloniert wird, der anschließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren. Das DNA-Molekül wird beispielsweise mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den Vektor eingefügt. Für den Vektor gilt wiederum das oben bereits angeführte. Wichtig ist bei diesem Verfahren, dass ein effizientes Wirt-Vektor System gewählt wird. Um ein aktives Enzym zu erhalten sind eukaryotische Wirtszellen besonders geeignet. Eine Möglichkeit besteht darin, den Vektor in Insektenzellen zu transfektieren. Dabei wäre insbesondere ein Insektenvirus als Vektor zu verwenden, so z.B. Baculovirus.

Selbstverständlich können menschliche oder andere Wirbeltierzellen ebenfalls transfektiert werden, wobei diese ein ihnen fremdes Enzym exprimieren würden.

Bevorzugterweise wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zumindest einer der erfindungsgemäßen Vektoren, nämlich der

umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül, das mutierte DNA-Molekül oder das DNA-Molekül, das für Ribozyme codiert oder der umfassend das DNA-Molekül in inverser Orientierung zum Promotor, in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird. Hier gilt ebenfalls das oben für die Transfektion bereits Beschriebene.

Als Wirtszellen können z.B. Pflanzenzellen verwendet werden, wobei hier beispielsweise das Ti-Plasmid mit dem Agrobacterium-System in Frage kommt. Es ist mit dem Agrobacterium-System möglich, direkt eine Pflanze zu transfektieren: Agrobakterien verursachen bei Pflanzen Wurzelhalsgallen. Wenn Agrobakterien eine verletzte Pflanze infizieren, gelangen die Bakterien selbst nicht in die Pflanze, sondern sie schleusen den rekombinanten DNA-Abschnitt, die sogenannte T-DNA aus dem ringförmigen, extrachromosomalen, tumorinduzierenden Ti-Plasmid in die Pflanzenzellen ein. Die T-DNA, und damit auch das darin eingefügte DNA-Molekül, wird stabil in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut, so dass die Gene der T-DNA in der Pflanze exprimiert werden.

Es gibt zahlreiche bekannte, effiziente Transfektionsmechanismen für verschiedene Wirtssysteme. Einige Beispiele sind Elektroporation, die Calciumphosphatmethode, Mikroinjektion, Liposomenmethode.

Die transfektierten Zellen werden anschließend selektiert, z.B. aufgrund von Antibiotika-Resistenzen, für die der Vektor Gene aufweist, oder anderer Markergene. Danach werden die transfektierten Zelllinien amplifiziert, entweder in kleineren Mengen, z.B. in Petrischalen, oder in großen Mengen, etwa in Fermentoren. Weiters weisen Pflanzen eine besondere Eigenschaft auf, sie sind nämlich in der Lage sich aus einer (transfektierten) Zelle bzw. aus einem Protoplasten zu einer vollständigen Pflanze wieder zu entwickeln, die gezüchtet werden kann.

Je nach eingesetztem Vektor kommt es zu Vorgängen im Wirt, so dass die Enzym-Expression unterdrückt oder vollständig unterbunden wird:

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül mit der Deletions-Insertions- oder Substitutionsmutation transfektiert, so kommt es zu einer homologen Rekombination: Das mutierte DNA-Molekül erkennt trotz Mutation die identische Sequenz im Genom der

Wirtszelle und wird an genau der Stelle eingebaut, so dass ein "Knockout-Gen" entsteht. Auf diese Weise wird in das Gen für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase eine Mutation eingebracht, die die einwandfreie Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase inhibieren kann. Wie oben schon dargelegt ist es bei dieser Technik wichtig, dass die Mutation ausreicht, um die Expression des aktiven Proteins zu unterbinden. Nach Selektion und Amplifikation kann als zusätzliche Überprüfung das Gen sequenziert werden, um den Erfolg der homologen Rekombination bzw. den Grad der Mutation festzustellen.

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, transfektiert, so wird in der Wirtszelle das aktive Ribozym exprimiert. Das Ribozym komplexiert die komplementäre mRNA Sequenz der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zumindest an einer bestimmten Stelle, schneidet diese Stelle und kann auf diese Weise die Translation des Enzyms inhibieren. In dieser Wirtszelle sowie in den von ihr abstammenden Zelllinien bzw. gegebenenfalls Pflanze wird keine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimiert.

Im Falle des Vektors umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül in Sense- oder inverser Richtung zum Promotor, wird in der transfektierten Zelle (bzw. Pflanze) eine Sense- oder Antisense-mRNA exprimiert. Die Antisense-mRNA ist komplementär zu zumindest einem Teil der mRNA-Sequenz der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase und kann ebenfalls die Translation des Enzyms inhibieren. Als Beispiel für ein Verfahren zur Unterdrückung der Expression eines Gens durch Antisense-Technik wird auf die Schrift Smith et al. 1990, Mol.Gen.Genet. 224:477-481 verwiesen, wobei in dieser Schrift die Expression eines Gens, das im Reifungsprozess bei Tomaten involviert ist, inhibiert wird.

In allen Systemen wird die Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zumindest unterdrückt, vorzugsweise sogar vollständig unterbunden. Der Grad der Störung der Genexpression hängt vom Grad der Komplexierung, homologen Rekombination, von eventuellen anschließenden zufälligen Mutationen, und sonstigen Vorgängen im Bereich des Genoms ab. Die transfektierten Zellen werden auf GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase Aktivität überprüft und selektiert.

Es besteht weiters die Möglichkeit, die oben beschriebene

Unterdrückung der Expression der $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase noch weiter zu verstärken, indem zusätzlich zur Einschleusung eines oben beschriebenen Vektors, ein Vektor umfassend ein Gen, das für ein Säugetier-Protein, z.B. $\beta 1,4$ -Galaktosyltransferase, codiert, in den Wirt eingeschleust wird. Die Fucosylierung kann durch die Wirkung anderer Säugetier-Enzyme vermindert werden, wobei die Kombination der Inhibierung der Expression einer aktiven $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Vektors und mit Hilfe eines Säugetier-Enzym-Vektors besonders effizient ist..

Für die Transfektion kann jegliche Pflanzensorte eingesetzt werden, beispielsweise die Mungo Bohne, Tabakpflanze, Tomaten- und/oder Kartoffelpflanze.

Ein anderes, vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, besteht darin, dass das DNA-Molekül umfassend die Mutation in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird (Schaefer et al. 1997, Plant J.; 11(6):1195-1206). Dieses Verfahren funktioniert demnach nicht mit einem Vektor, sondern mit einem reinen DNA-Molekül. Das DNA-Molekül wird z.B. durch Genbombardement, Mikroinjektion oder Elektroporation, um nur drei Beispiele zu nennen, in den Wirt eingeschleust. Wie oben bereits dargelegt, legt sich das DNA-Molekül an die homologe Sequenz im Genom des Wirtes an, so dass es zu einer homologen Rekombination und damit zur Aufnahme der Deletions-, Insertions- bzw. Substitutionsmutation im Genom kommt: Die Expression der GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase kann unterdrückt bzw. vollständig unterbunden werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie Insekten bzw. Insektenzellen, wobei ihre GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase-Aktivität unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in natürlichen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen und Insekten bzw. Insektenzellen vorkommende GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase-Aktivität beträgt. Der Vorteil dieser Pflanzen bzw. Pflanzenzellen liegt darin, dass die Glykoproteine, die von ihnen produziert werden, keine bzw. kaum $\alpha 1,3$ -gebundene Fucose aufweisen. Werden nun Produkte dieser Pflanzen bzw. Insekten vom menschlichen oder Wirbeltier-Körper aufgenom-

men, kommt es zu keiner Immunreaktion gegen das $\alpha 1,3$ -Fucose-Epitop.

Vorzugsweise werden rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen zur Verfügung gestellt, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

Die Erfindung betrifft ebenfalls rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und dass ihre GlcNAc $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist. Auch hier werden keine Glykoproteine mit $\alpha 1,3$ -gebundenen Fucoseresten produziert, so dass es ebenfalls zu keiner Immunreaktion gegen das $\alpha 1,3$ -Fucose-Epitop kommt.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein PNA-Molekül, das eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls sowie Teilsequenzen davon ist. PNA (Peptid Nukleinsäure) ist eine DNA ähnliche Sequenz, wobei die Nukleobasen an ein Pseudopeptidrückgrat gebunden sind. PNA hybridisiert im allgemeinen mit komplementären DNA-, RNA- oder PNA-Oligomeren durch Watson-Crick Basenpaarung und Helixformation. Das Peptidrückgrat gewährleistet eine größere Resistenz gegenüber enzymatischer Degradation. Das PNA-Molekül stellt dadurch ein verbessertes Antisense-Agens dar. Weder Nukleasen noch Proteasen sind in der Lage, ein PNA-Molekül anzugreifen. Die Stabilität des PNA-Moleküls, wenn es an eine komplementäre Sequenz gebunden ist, weist eine ausreichende sterische Blockierung von DNA und RNA Polymerasen, der reversen Transkriptase, Telomerase und der Ribosome.

Weist das PNA-Molekül die oben genannte Sequenz auf, so bindet sie an die DNA bzw. an ein Stelle der DNA, die für GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase codiert, und kann auf diese Weise die Transkription dieses Enzyms inhibieren. Das PNA-Molekül, da es weder transkribiert noch translatiert wird, wird synthetisch hergestellt, z.B. mit Hilfe der t-Boc-Technik.

Vorteilhafterweise wird ein PNA-Molekül zur Verfügung gestellt, das eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls sowie Teilsequenzen davon entspricht. Dieses PNA-Molekül komplexiert die mRNA bzw. eine

Stelle der mRNA der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, so dass die Translation des Enzyms inhibiert ist. Hier trifft ähnliches, wie für die Antisense-RNA zu. So ist z.B. ein besonders effizienter Komplexierungsbereich die Translationsstart-Region oder auch die 5'-nichttranslatierten Regionen der mRNA.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass erfindungsgemäße PNA-Moleküle in die Zellen eingeschleust werden. Um das PNA-Molekül bzw. die PNA-Moleküle in die Zelle einzuschleusen, werden wiederum die herkömmlichen Methoden, wie z.B. Elektroporation oder Mikroinjektion angewandt. Besonders effizient ist das Einschleusen, wenn die PNA-Oligomere an Zellen-Penetrationspeptide, z.B. Transportan oder pAntp, gebunden sind (Pooga et al. 1998, Nature Biotechnology, 16; 857-861).

Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Dabei werden wie oben schon beschriebene Vektoren umfassend Gene für die gewünschten Proteine in den Wirt bzw. Wirtszellen wie ebenfalls oben schon beschrieben transfektiert. Die transfektierten Pflanzen- oder Insektenzellen exprimieren die gewünschten Proteine, wobei sie keine oder kaum α 1,3-gebundene Fucose aufweisen. Dadurch lösen sie die oben bereits erwähnten Immunreaktionen im menschlichen oder Wirbeltier-Körper nicht aus. Es können jegliche Proteine in diesen Systemen produziert werden.

Vorzugsweise wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die erfindungsgemäßen, rekombin-

anten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Durch dieses Verfahren wird es möglich, menschliche Proteine in Pflanzen(zellen) zu produzieren, die, wenn sie durch den menschlichen Körper aufgenommen sind, keine gegen α 1,3-gebundene Fucosereste gerichtete Immunreaktion auslösen. Dabei besteht die Möglichkeit, Pflanzensorten zur Produktion der rekombinanten Glykoproteine einzusetzen, die als Nahrungsmittel dienen, z.B. Banane, Kartoffel und/oder Tomate. Die Gewebe dieser Pflanze umfassen das rekombinante Glykoprotein, so dass z.B. durch Extraktion des rekombinanten Glykoproteins aus dem Gewebe und anschließende Verabreichung bzw. direkt durch den Verzehr des pflanzlichen Gewebes das rekombinante Glykoprotein in den menschlichen Körper aufgenommen wird.

Bevorzugterweise ist dabei ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, das die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Hierbei kommt jegliches Protein in Frage, das medizinisch von Interesse ist.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung rekombinante Glykoproteine, wobei sie gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und wobei ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist. Vorzuziehen sind natürlich Glykoproteine, die keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen. Die Menge an α 1,3-gebundener

Fucose ist abhängig von dem Grad der oben beschriebenen Unterdrückung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase.

Bevorzugterweise betrifft die Erfindung rekombinante humane Glykoproteine, die gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden, und die in ihrer Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, die gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden, und die in ihrer Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen.

Diese erfindungsgemäßen Glykoproteine können andere gebundene Oligosaccharid-Einheiten, die für Pflanzen bzw. Insekten spezifisch sind, aufweisen, wodurch sie sich - im Falle von humanen Glykoproteinen - von diesen natürlichen Glykoproteinen unterscheiden. Nichtsdestotrotz werden durch die erfindungsgemäßen Glykoproteine eine geringere bzw. gar keine Immunreaktion im menschlichen Körper ausgelöst, da, wie in der Beschreibungseinleitung schon dargestellt, die α 1,3-gebundenen Fucose-Reste die Hauptursache der Immunreaktionen bzw. Kreuz-Immunreaktionen gegen pflanzliche und Insekten-Glykoproteine sind.

Ein weiterer Aspekt umfasst eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Glykoproteine umfasst. Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Glykoproteinen umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung weitere, für solche Zusammensetzungen übliche Zusätze. Dies sind z.B. geeignete Verdünnungsmittel verschiedenen Puffergehalts (z.B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), pH und Ionenstärke, Additive, wie etwa Tenside und Lösungsmittel (z.B. Tween 80, Polysorbate 80), Konservierungsmittel (z.B. Thimerosal, Benzylalkohol), Adjuvantien, Antioxidationsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Natriummetabisulfit), Emulgatoren, Füllstoffe (z.B. Lactose, Mannitol), kovalente Bindung von Polymeren, wie etwa Polyethylenglykol, an das Protein, Einbau des

Materials in teilchenförmige Zubereitungen von polymeren Verbindungen, wie etwa Polymilchsäure, Polyglykolsäure, etc oder in Liposome, Hilfsstoffe und/oder Trägerstoffe, die bei der jeweiligen Behandlung nützlich sind. Solche Zusammensetzungen werden den physikalischen Zustand, die Stabilität, die Geschwindigkeit der in-vivo Freisetzung und die Geschwindigkeit der in-vivo Ausscheidung der erfindungsgemäßen Glykoproteine beeinflussen.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen zur Verfügung, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, wobei die erfindungsgemäßen, markierten DNA-Moleküle zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden. Die hybridisierten DNA-Moleküle können detektiert, quantifiziert und selektiert werden. Damit die Probe Einzelstrang-DNA aufweist, mit der die markierten DNA-Moleküle hybridisieren können, wird die Probe, z.B. durch Erwärmen, denaturiert.

Eine Möglichkeit besteht darin, die zu untersuchende DNA, eventuell nach Zusetzen von Endonukleasen, durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel zu trennen. Nach Überführen auf eine Membran aus Nitrozellulose werden die erfindungsgemäßen markierten DNA-Moleküle zugesetzt, die an das entsprechende homologe DNA-Molekül hybridisieren ("Southern Blotting").

Eine andere Möglichkeit besteht darin, homologe Gene aus anderen Spezies durch PCR-abhängige Verfahren unter Verwendung von spezifischen und/oder degenerierten Primern, abgeleitet aus der Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls, aufzufinden.

Bevorzugt umfasst die Probe für das obengenannte erfinderische Verfahren genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus. Durch dieses Verfahren wird auf sehr schnelle und effiziente Weise eine große Anzahl von Pflanzen und Insekten auf das Vorhandensein des GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Gens untersucht. Auf diese Weise können Pflanzen und Insekten, die dieses Gen nicht aufweisen, selektiert werden bzw. können in solchen Pflanzen und Insekten, die dieses Gen aufweisen, durch ein oben beschriebenes, erfindungsgemäßes Verfahren die Expressierung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase unterdrückt bzw. vollständig unterbunden werden, so dass sie anschließend zur Transfektion und Produktion von (humanen) Glykoproteinen eingesetzt werden

können.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, die nach den zwei zuletzt genannten Verfahren selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden. Diese Moleküle können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Sie können sequenziert und ihrerseits auch als DNA-Sonden zum Auffinden von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen verwendet werden. Diese - markierten - DNA-Moleküle werden für Organismen, die den Organismen, aus denen sie isoliert wurden, verwandt sind, effizienter als Sonden funktionieren, als die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Präparation von erfindungsgemäß klonierter GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.0 und 9.0, insbesondere zwischen 6.8 und 8.2, aufweist. Der pI-Wert eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung Null beträgt und ist abhängig von der Aminosäuresequenz, dem Glykosylierungsmuster als auch von der räumlichen Struktur des Proteins. Die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase umfasst zumindest 7 Isoformen, die einen pI-Wert in diesem Bereich aufweisen. Der Grund für die verschiedenen Isoformen der Transferase sind z.B. unterschiedliche Glykosylierungen sowie limitierte Proteolyse. Versuche zeigten, dass Mungobohnen-Sämlinge von verschiedenen Pflanzen unterschiedliche Verhältnisse der Isozyme aufweisen. Der pI-Wert eines Proteins kann durch isoelektrische Fokussierung, die dem Fachmann bekannt ist, festgestellt werden.

Die Haupt-Isoform des Enzyms weist ein apparentes Molekulargewicht von 54 kDa auf.

Insbesondere weist die erfindungsgemäße Präparation Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 auf.

Die Erfindung betrifft ebenso ein Verfahren zur Herstellung von "verpflanzlichten" Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, wobei zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem oben beschriebenen DNA-Molekül codierte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Klonierung von GlcNAc-

α 1,3-Fucosyltransferase ist es möglich, große Mengen gereinigtes Enzym herzustellen. Um eine voll aktive Transferase zu erhalten, werden geeignete Reaktionsbedingungen hergestellt. Es hat sich gezeigt, dass die Transferase eine besonders hohe Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 7 aufweist, wenn als Puffer 2- (N-Morpholino)Ethansulfonsäure-HCl verwendet wird. In Gegenwart von bivalenten Kationen, insbesondere Mn^{2+} , wird die Aktivität der rekombinanten Transferase verstärkt. Die Kohlenhydrat-Einheit wird entweder in ungebundener Form oder an ein Protein gebunden zur Probe zugesetzt. Die rekombinante Transferase ist für beide Formen aktiv.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, weiter erläutert werden. Im einzelnen zeigen in der Zeichnung die Fig. 1a und 1b die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven; die Fig. 2 die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 3 das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung und die gemessene Transferase-Aktivität der einzelnen Isoformen; die Fig. 4 die N-terminalen Sequenzen von 4 tryptischen Peptiden 1 - 4 sowie die DNA-Sequenz von drei Primern S1, A2 und A3; die Fig. 5a und 5b die cDNA-Sequenz der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 6a und 6b die daraus hergeleitete Aminosäuresequenz der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 7 eine schematische Darstellung der α 1,3-Fucosyltransferase sowie die Hydrophobizität der Aminosäuren-Reste; die Fig. 8 einen Vergleich der konservierten Motive verschiedener Fucosyltransferasen; die Fig. 9 einen Vergleich der Fucosyltransferase-Aktivität von mit dem α 1,3-Fucosyltransferase-Gen transfektierten Insektenzellen mit einer Negativkontrolle; die Fig. 10a und 10b Strukturen von verschiedenen Akzeptoren der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 11 und 12 Massenspektren; und die Fig. 13 das Ergebnis einer HPLC.

Beispiel 1:

Isolieren der Core- α 1,3-Fucosyltransferase

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Mungobohnen-Sämlinge

wurden in einem Mixer homogenisiert, wobei 0.75 Volumen Extraktionspuffer pro kg Bohnen verwendet wurde. Das Homogenisat wurde anschließend durch zwei Lagen Baumwollstoff filtriert und das Filtrat wurde bei 30000xg 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit Lösungspuffer über Nacht bei ständigem Rühren extrahiert. Anschließende Zentrifugation bei 30000xg für 40 min ergab den Triton-Extrakt.

Der Triton-Extrakt wurde wie folgt gereinigt:

Schritt 1: Der Triton-Extrakt wurde auf einen mikrogranulären Diäthylaminoäthyl-Zellulose-Anionenaustauscher DE52 Zellulose-Säule (5x28 cm, Fa. Whatman), der zuvor mit Puffer A kalibriert wurde, aufgetragen. Die nicht gebundene Fraktion wurde in Schritt 2 weiterbehandelt.

Schritt 2: Die Probe wurde auf eine mit Puffer A kalibrierte Affi-Gel Blue Säule (2.5x32) Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit diesem Puffer wurde adsorbiertes Protein mit Puffer A umfassend 0.5 M NaCl eluiert.

Schritt 3: Nach Dialyse des Eluats aus Schritt 2 gegen Puffer B wurde es auf eine, mit demselben Puffer kalibrierte, S-Sepharose-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.5 M NaCl in Puffer B eluiert. Fraktionen mit GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase wurden gepoolt und gegen Puffer C dialysiert.

Schritt 4: Die dialysierte Probe wurde auf eine mit Puffer C kalibrierte GnGn-Sepharose-Säule aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit Puffer C umfassend 1 M NaCl anstelle von $MnCl_2$ eluiert.

Schritt 5: Das Enzym wurde anschließend gegen Puffer D dialysiert und auf eine GDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule aufgebracht. Nach Waschen der Säule mit Puffer D wurde die Transferase durch Ersetzen von $MgCl_2$ und NaCl mit 0.5 mM GDP eluiert. Aktive Fraktionen wurden gepoolt, gegen 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3, dialysiert und lyophilisiert.

Die enzymatische Aktivität der GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase wurde durch Verwendung von GnGn-Peptid und GDP-L-[U- ^{14}C] Fucose bei Substratkonzentrationen von jeweils 0.5 und 0.25, in Gegenwart von 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCl Puffer, Triton X-100, $MnCl_2$, GlcNAc und AMP bestimmt (gemäß Staudacher et al. 1998 Glycoconjugate J. 15, 355-360; Staudacher et al. 1991

Eur.J.Biochem. 199, 745-751).

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bichinchoninsäure Methode (Pierce) oder, bei den letzten Schritten der Enzymreinigung, mittels Aminosäurenanalyse bestimmt (Altmann 1992 Anal.Biochem. 204, 215-219).

In Fig 1a und 1b sind die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven dargestellt. Fig. 1a zeigt die oben beschriebene Trennung auf der S-Sepharose Säule, Fig. 1 b die Trennung auf der GnGn-Sepharose-Säule, wobei der Kreis Protein, der schwarze, volle Kreis GlcNAC- α 1,3-Fucosyltransferase und das Viereck N-Acetyl- β -Glucosaminidase darstellt. Ein U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μ mol Fucose auf einen Akzeptor pro Minute tranferiert.

Tabelle 1 zeigt die einzelnen Schritte der Transferase-Reinigung.

Tabelle 1

Reinigungsschritt	Ges. Prot.	Ges. Aktiv.	Spez. Aktiv.	Reinigungs Faktor	Ausbeute
	mg	mU	mU/mg	-fach	%
Triton X-100					
Extrakt	91500	4846	0.05	1	100
DE52	43700	4750	0.10	2	98.0
Affigel Blue	180.5	4134	23	460	85.3
S-Sepharose	8.4	3251	390	7800	67.1
GnGn-Sepharose	0.13 ¹	1044	8030	160000	21.5
GDP-Hexanolamin-Sepharose	0.02 ¹	867	43350	867000	17.9

¹ wurde mittels Aminosäure-Analyse ermittelt

Extraktionspuffer:

0.5 mM Dithiothreitol
1 mM EDTA
0.5 % Polyvinylpyrrolidon
0.25 M Saccharose
50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3

Lösungspuffer:

0.5 mM Dithiothreitol
1 mM EDTA
1.5% Triton X-100
50 mM Tris-HCl, pH 7.3

Puffer A:

25mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3 mit:
0.1% Triton X-100 und
0.02% NaN_3

Puffer B:

25 mM Na-Citrat Puffer, pH 5.3 mit:
0.1% Triton X-100 und
0.02% NaN_3

Puffer C:

25 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3 mit:
5 mM MnCl_2 und
0.02% NaN_3

Puffer D.

25 mM Tris-HCl, pH 7.3 mit:
10 mM MgCl_2 ,
0.1 M NaCl und
0.02% NaN_3

Beispiel 2:

SDS-Page und isoelektrische Fokussierung

Eine SDS-Page wurde in einer Biorad-Mini-Protean-Zelle auf Gelen mit 12.5% Acrylamid und 1% Bisacrylamid durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blau R-250 oder Silber gefärbt. Isoelektrische Fokussierung der Fucosyltransferase wurde auf vorgefertigten Gelen mit einem pI-Bereich zwischen 6-9 (Servalyt precotes 6-9, Serva) durchgeführt. Die Gele

wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers mit Silber gefärbt. Für die zweidimensionale Elektrophorese wurden Banden aus dem Fokussierungsgel ausgeschnitten, mit S-Alkylierungs-Reagentien und SDS behandelt und einer SDS-Page, wie oben beschrieben, unterzogen.

Fig. 2 stellt die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase dar, wobei links die zweidimensionale Elektrophorese und rechts die eindimensionale SDS-Page dargestellt sind. Dabei ist die mit A bezeichnete Bahn ein Standard, die mit B bezeichnete Bahn die GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase aus der GnGn-Sepharose-Säule und die mit C bezeichnete Bahn "gereinigte" GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, d.h. die Fraktion der GDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule. Die zwei Banden bei 54 und 56 kDa stellen Isoformen der Transferase dar.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung. Bahn A wurde mit Silber gefärbt, auf Bahn B wurde Aktivität der Transferase Isoformen getestet. Die Aktivität ist dabei als % Fucose angegeben, die GDP-Fucose auf das Substrat transferiert wurde.

Beispiel 3:

Peptidsequenzierung

Für die Sequenzierung des Proteins wurden Banden aus dem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel geschnitten, carboxyamidomethyliert und mit Trypsin gemäß Görg et al. 1988, Electrophoresis, 9, 681-692, gespalten. Die tryptischen Peptide wurden mit der reversen Phase HPLC auf einer 1.0x250 mm Vydac C18 bei 40°C mit einer Durchflussrate von 0.05 ml/min getrennt, wobei ein HP 1100 Apparat (Hewlett-Packard) verwendet wurde. Die isolierten Peptide wurden mit Hewlett-Packard G1005A Protein Sequenzierungs System gemäß dem Protokoll des Herstellers sequenziert. Weiters wurde die Peptidmischung durch Ingel-Verdauung mit MALDI-TOF MS analysiert (siehe unten).

Fig. 4 zeigt die N-terminalen Sequenzen von 4 tryptischen Peptiden 1 - 4 (SEQ ID No: 5-8). Ausgehend von den ersten drei Peptiden wurden Primer S1, A2 und A3 hergestellt (Sequenz-Identifikationsnummern 9-11).

Beispiel 4:

RT-PCR und cDNA Klonieren

Die gesamte RNA wurde aus einem 3 Tage alten Mungo Bohnen Hypokotyl isoliert, wobei das SV Total RNA Isolierungs System von Promega verwendet wurde. Zur Herstellung der Erststrang-cDNA wurde die gesamte RNA 1 h bei 48°C mit AMV reverse Transkriptase und Oligo(dT) Primern inkubiert, wobei das Reverse Transkription System von Promega verwendet wurde.

Die Erststrang-cDNA wurde einer PCR unterzogen, wobei eine Kombination von Sense- und Antisense-Primern verwendet wurde:

Zu 10 µl der reversen Transkription Reaktion wurde folgendes zugesetzt:

50 µl mit 0.1µmol eines jeden Primers, 0.1 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 9.0, 50 mM KCl und 0.1 % Triton X-100.

Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min, wurden 40 Zyklen von 1 min bei 95°C, 1 min bei 49°C und 2 min bei 72°C durchlaufen. Der letzte Extensionsschritt wurde bei 72°C für 8 min durchgeführt. PCR Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert, wobei das TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet wurde, und sequenziert. Die Produkte dieser PCR waren zwei DNA-Fragmente mit der Länge von 744bp und 780bp, wobei beide DNA-Fragmente dasselbe 5'-Ende aufweisen (s. auch Fig.7).

Ausgehend von diesen zwei DNA-Fragmenten wurden die fehlenden 5' und 3' Regionen der cDNA durch 5'- und 3'- Rapid Amplifikation von cDNA-Enden (RACE) erhalten, wobei der RACE Kit von Gibco-BRL verwendet wurde. Als Antisense-Primer wurde der universelle Amplifikations-Primer des Kits und als Sense-Primer entweder 5'-CTGGAAGTGTCCCTGTGGTT-3' (SEQ ID No: 12) oder 5'-AGTGCACTAGAGGGCCAGAA-3' (SEQ ID No: 13) verwendet. Es wurde auch als Sense Primer der verkürzte Anker-Primer des Kits und als Antisense-Primer 5'-TTCGAGCACCAATTTGGAAAT-3' (SEQ ID No: 14) oder 5'-GAATGCAAAGACGGCACGATGAAT-3' (SEQ ID No: 15) verwendet.

Die PCR wurde mit einer Annealing Temperatur von 55°C und den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die 5' und 3' RACE Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert und se-

quenziert: Die Sequenzen der subklonierten Fragmente wurden mittels der Didesoxynukleotid-Methode sequenziert (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit und ABI PRISM 310 Genetic analyser (Perkin Elmer)). T7 und M13 Vorwärts-Primer wurden für die Sequenzierung der in den pCR2.1 Vektor klonierten Produkte verwendet. Beide Stränge der Codierungsregion wurden vom Vienna VBC Genomics-Sequencing Service sequenziert, wobei infrarotmarkierte Primer (IRD700 und IRD800) und ein LI-COR Long Read IR 4200 Sequenzierer (Lincoln, NE) verwendet wurden.

Fig. 5a und 5b zeigen die gesamte cDNA, die eine Größe von 2198 bp und einen offenen Leserahmen von 1530 bp aufweist (SEQ ID No: 1). Der offene Leserahmen (Startcodon bei Basenpaaren 211-213, Stopcodon bei Basenpaar 1740-1743) codiert für ein Protein von 510 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56.8 kDa und einem theoretischen pI-Wert von 7.51.

Fig. 6a und 6b zeigen die von der cDNA hergeleitete Aminosäuresequenz der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase (SEQ ID No: 2). Stellen für die Asparagin gebundene Glykosylierung sind bei Asn346 und Asn429.

In Fig. 7 ist die schematische GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-cDNA (oben) und der hergeleitete Hydrophobizitätsindex des codierten Proteins (unten) dargestellt, wobei ein positiver Hydrophobizitätsindex eine erhöhte Hydrophobizität bedeutet. Dazwischen sind die Größen der beiden oben genannten PCR-Produkte in Relation zur kompletten cDNA gezeigt. Der Codierungs-Bereich ist durch den Balken dargestellt, wobei "C" für den postulierten cytoplasmatischen Bereich, T für den postulierten transmembranen Bereich und G für den postulierten Golgi-Lumen katalytischen Bereich der Transferase codiert. Die Analyse der DNA-Sequenz durch "TMPred" (von EMBnet, Schweiz) ergab eine vermutliche Transmembran-Region zwischen Asn36 und Gly54. Der C-terminale Bereich des Enzyms umfasst vermutlich die katalytische Region und sollte folglich in das Lumen des Golgi-Apparats weisen. Demnach scheint diese Transferase ein Transmembranprotein des Typs II zu sein, wie alle bisher analysierten Glykosyltransferasen, die eine Rolle in der Glykoprotein-Biosynthese spielen (Joziase, 1992 Glycobiology 2, 271-277). Die grauen Bereiche stellen die vier tryptischen Peptide, die Sechsecke die potentiellen N-Glykosylierungs-Stellen dar. Eine via NCBI zugängliche

BLASTP Suche aller Datenbanken zeigte eine Ähnlichkeit zwischen der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase und anderen α 1,3/4-Fucosyltransferasen, z.B. der humanen Fucosyltransferase-VI. Mit 18-21% (untersucht von SIM-LALNVIEW, Expase, Schweiz) war die Gesamtähnlichkeit jenseits jeglicher Signifikanz. Dennoch weist ein Sequenzbereich von 35 Aminosäuren (SEQ ID No: 4) eine auffallend hohe Homologie zu anderen α 1,3/4 Fucosyltransferasen auf (Fig. 8). Dieser Sequenzbereich befindet sich zwischen Glu267 und Pro301 der SEQ ID No: 2.

Beispiel 5:

Expression der rekombinanten GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase in Insektenzellen

Die codierende Region der vermutlichen GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase samt cytoplasmatischer und transmembraner Region wurde mit dem Vorwärts-Primer 5'-CGGCGGATCCGCAATTGAATGATG-3' (SEQ ID NO: 16) und Rückwärts-Primer 5'-CCGGCTGCAGTACCATTAGCGCAT-3' (SEQ ID No: 17) mit dem Expand High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit PstI und BamHI doppelt verdaut und in Alkalin-Phosphatase behandeltem Baculovirus Transfer-Vektor pVL1393, der zuvor mit PstI und BamHI verdaut wurde, subkloniert. Um eine homologe Rekombination zu gewährleisten, wurde der Transfervektor mit Baculo Gold viraler DNA (PharMingen, San Diego, CA) in Sf9 Insektenzellen in IPL-41 Medium mit Lipofectin cotransfiziert. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 27°C wurden verschiedene Volumina des Überstandes mit dem rekombinanten Virus zur Infektion der Sf21 Insektenzellen verwendet. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 27°C in IPL-41 Medium mit 5% FCS wurden die Sf1 Zellen geerntet und 2x mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 25 mM Tris HCL Puffer, pH 7.4, mit 2% Triton X-100 resuspendiert und durch Sonifikation auf Eis aufgebrochen.

Beispiel 6:

Assay für die GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase-Aktivität

Das Homogenat und der Zellüberstand wurden auf GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase getestet. Blindproben wurden mit rekombinatem Baculovirus, der für die Tabak-GlcNAc-Transferase I (Strasser et al. 1999, Glycobiology, im Druck) codiert, durchgeführt.

Fig. 9 zeigt die gemessene Enzymaktivität der rekombinanten GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase sowie der Negativkontrolle. Im besten Fall war die Enzymaktivität der cotransfektierten Zellen und deren Überstand 30x höher als die der Negativkontrollen. Diese endogene Aktivität, die in Abwesenheit der rekombinanten Transferase messbar ist, kommt im wesentlichen von der Insekten- α 1,6-Fucosyltransferase und nur zu einem geringen Prozentsatz von der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase. Demnach beträgt die Erhöhung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die von den rekombinanten Baculoviren stammt, weit über das 100fache.

Das Enzym zeigte eine breite Maximal-Aktivität um einen pH-Wert von 7.0, wenn die Aktivität in 2-(N-Morpholin) Ethansulfonsäure-HCl Puffer gemessen wurde. Wie in Tabelle 2 ersichtlich ist, fördert der Zusatz von bivalenten Kationen, insbesondere Mn^{2+} , die Aktivität der rekombinanten Transferase.

Tabelle 2

Zusatzmittel (konz. 10mM)	relative Aktivität (Akzeptor : GnGn-Peptid)
	%
kein	21
EDTA	18
MnCl ₂	100
CaCl ₂	82
MgCl ₂	52
CdCl ₂	44
CoCl ₂	35
CuCl ₂	3
NiCl ₂	24
ZnCl ₂	0.6

Tabelle 3 zeigt, dass unter den eingesetzten Akzeptoren das GnGn- Peptid die höchsten Inkorporationsraten bei Standard Versuchsbedingungen zeigt, knapp gefolgt vom GnGnF⁶-Peptid und M5Gn-Asn. Kein Transfer konnte auf das MM-Peptid festgestellt werden, welches das reduzierende GlcNAc-Ende an der 3-gebundenen Mannose nicht aufweist. Diese Struktur scheint für die Core-Fucosyltransferase notwendig zu sein. Die rekombinante Transferase war weiters inaktiv hinsichtlich die gebräuchlichen Akzeptoren, die für die Bestimmung der Blutgruppen α 1,3/4-Fucosyltransferasen, die die Fucose auf GlcNAc an den nicht reduzierenden Enden von Oligosacchariden transferieren. Die scheinbaren K_m-Werte für

die Akzeptor-Substrate GnGn-Peptid, GnGnF⁶-Peptid, M5Gn-Asn und für das Donor Substrat GDP-Fucose wurden auf 0.19, 0.13, 0.23 bzw. 0.11 geschätzt. Die Strukturen der Moleküle sind in Fig. 10a und 10b dargestellt.

Tabelle 3

Akzeptor-Substrat	rel. Aktivität	K _m -Wert
	%	mM
GnGn-Peptid	100	0.19
GnGnF ⁶ -Peptid	87	0.13
M5Gn-Asn	71	0.23
MM-Peptid	0	
Gal β 1-4GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0	

Beispiel 7:

Massenspektrometrie des Fucosyl-Transferase Produkts

Dabsyliertes GnGn-Hexapeptid (2nmol) wurde mit dem Insektenzellen-Homogenat umfassend die rekombinante GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase (0.08 mU) in Gegenwart von nicht radioaktiver GDP-L-Fucose (10 nmol), 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCL Puffer, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc und AMP inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde mit einem Homogenat der für die Blindproben infizierten Insektenzellen durchgeführt. Die Proben wurden für 16 h bei 37°C inkubiert und mittels MALDI TOF Massenspektrometrie analysiert.

Massenspektrometrie wurde auf einem DYNAMO (Thermo BioAnalysis, Santa Fe, NM) durchgeführt, einem MALDI-TOF MS, das zur dynamischen Extraktion fähig ist (Synonym für verspätete Extraktion). Es wurden zwei Arten von Probenmatrix-Präparationen eingesetzt: Peptide und dabsylierte Glykopeptide wurden in 5% Ameisensäure gelöst und Aliquote wurden auf das Ziel aufgetragen, Luft getrocknet und mit 1% α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure bedeckt. Pyridylaminierte Glykane, reduzierende Oligosaccharide und nicht derivatisierte Glykopeptide wurden mit Wasser verdünnt, auf das Ziel aufgetragen und Luft getrocknet. Nach Zusatz von 2% 2,5-Dihydroxybenzoesäure wurden die Proben sofort durch Anlegen eines Vakuums getrocknet.

Fig. 11 zeigt das Massenspektrum dieser Proben, wobei A die Negativkontrolle darstellt: Der Hauptpeak (S) zeigt das Dabsyl-Val-Gly-Glu-(GlcNAc₄Man₃)Asn-Arg-Thr Substrat, wobei der errechnete $[M+H]^+$ Wert 2262.3 beträgt. Dieses Substrat scheint auch als Natrium Additionsprodukt und als kleineres Ion, das durch Fragmentation der Azo-Funktion der Dabsyl-Gruppe entstanden ist, bei (S*) auf. Eine geringe Produktmenge (P, $[M+H]^+ = 2408.4$) ist auf die endogene α 1,6-Fucosyltransferase zurückzuführen. Der Peak bei $m/z = 2424.0$ zeigt die unvollständige Degalactosylierung des Substrats. Das Massenspektrum B zeigt die Probe mit rekombinanter α 1,3-Fucosyltransferase. Der Hauptpeak (P) stellt das fucosylierte Produkt dar, (P*) dessen fragmentiertes Ion.

Zusätzlich wurden Aliquote beider Proben miteinander vermischt, um ähnliche Konzentraturen von Substrat und Produkt zu erhalten (Probe A). Diese Mischung wurde mit 0.1 M Ammoniumacetat, pH 4.0, umfassend 10 μ U N-Glykosidase A (Probe B) oder mit 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, umfassend 100 μ U (1 U hydrolysiert 1 μ mol Substrat pro min) N-Glykosidase F (Probe C) verdünnt. Nach 2 und 20h wurden kleine Aliquote dieser Mischungen entnommen und mittels MALDI-TOF MS analysiert.

In Fig. 12 sind die drei Massenspektren der Proben A, B und C dargestellt. Die unverdaute Probe A zeigt zwei Hauptpeaks: Das Substrat bei 2261.4 m/z und das fucosylierte Produkt bei 2407.7 m/z . Die mittlere Kurve zeigt das Massenspektrum der Probe B, mit N-Glykosidase A behandelt, die beide Glykopeptide hydrolysiert. Der Peak bei 963.32 stellt das deglycosylierte Produkt dar. Die untere Kurve zeigt das Massenspektrum der Probe C. Die

N-Glykosidase F ist nicht in der Lage, α 1,3 fucosylierte Substrate zu hydrolysieren, so dass das Spektrum den Peak bei 2406.7 m/z des fucosylierten Produkts aufweist, während der Peak des hydrolysierten Substrats bei 963.08 m/z aufscheint.

Beispiel 8:

HPLC Analyse des pyridylaminierten Fucosyltransferase-Produkts

Die beiden oben beschriebenen Proben (fucosyliertes Produkt und Negativkontrolle) wurden mit N-Glykosidase A verdaut. Die erhaltenen Oligosaccharide wurden pyridylaminiert und mittels reverse Phase HPLC analysiert (Wilson et al. 1998 Glycobiology 8, 651-661; Kubelka et al. 1994 Arch.Biochem.Biophys.308, 148-157; Hase et al. 1984 J.Biochem. 95, 197-203).

In Fig. 13 stellt im oberen Diagramm B die Negativkontrolle dar, wobei zusätzlich zum Restsubstrat (GnGn-Peptid) α 1,6 fucosyliertes Produkt zu sehen ist. A weist einen Peak bei wesentlich geringerer Retentionszeit auf, was für an den reduzierenden GlcNAc- α 1,3-gebundene Fucose spezifisch ist.

Im unteren Diagramm wurde das isolierte Transferase-Produkt vor (Kurve A) und nach Verdauung durch N-Acetyl- β -Glukosaminidase (Kurve B) mit MMF³ aus Honigbiene Phospholipase A₂ (Kurve C) verglichen.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Altmann Dr., Friedrich

<120> alpha 1,3-Fucosyltransferase R36247

<130> R 36247

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> Pflanze

<400> 1

```
actaactcaa acgctgcatt ttcttttttc tttcagggaa ccatccaccc ataacaacaa 60
aaaaaacaac agcaagctgt gtttttttta tegtctcttt tctttaaaca agcacccecca 120
tcatggaatc gtgtcctataa cgccaaaatt ttccatttcc ctttgatttt tagttttattt 180
tgcggaattg gcagttgggg gcgcaattga atgatgggtc tgttgacgaa tcttcgaggc 240
tcgagaacag atggtgcccc acaagacagc ttaccggttt tggctccggg aggcaaccca 300
aagaggaaat ggagcaatct aatgcctctt gttgttgccc ttgtgggtcat cgcggagatc 360
gcgtttcttg gtaggttgga tatggccaaa aacgccgcca tgggtgactc cctcgctgac 420
ttcttctacc gctctcgagc ggtcgttgaa ggtgacgatt tggggttggg tttggtggct 480
tctgatcgga attctgaatc gtatagttgt gaggaatggt tggagaggga ggatgctgtc 540
acgtattcga ggggtctttc caaagagcct atttttgttt ctggagctga tcaggagtgg 600
aagtcgtgtt cgggttgatg taaatttggg tttagtgggg atagaaagcc agatgccgca 660
tttgggttac ctcaaccaag tggaacagct agcattctgc gatcaatgga atcagcagaa 720
tactatgctg agaacaatat tgccatggca agacggaggg gatataacat cgtaatgaca 780
accagtctat ctteggatgt tcctgttgga tatttttcat gggctgagta tgatatgatg 840
gcaccagtgc agccgaaaac tgaagctgct cttgcagctg ctttcatttc caattgtggt 900
gctcgaaatt tccggttgca agctcttgag gcccttgaaa aatcaaacat caaaattgat 960
tcttatgggtg gttgtcacag gaaccgtgat ggaagagtga acaaagtgga agccctgaag 1020
cactacaaat ttagcttagc gtttgaaaat tcgaatgagg aagattatgt aactgaaaaa 1080
ttcttccaat cccttggtgc tggaactgtc cctgtggttg ttggtgctcc aaatattcag 1140
gactttgtc cttctcctgg ttcaatttta catattaaag agatagagga tgttgagtct 1200
gttgcaaaga ccatgagata tctagcagaa aatcccgaag catataatca atcattgagg 1260
tggaagtatg aggggtccatc tgactccttc aaggcccttg tggatatggc agctgtgcat 1320
tcatcgtgcc gtctttgcat tcaactggcc acagtgagta gagagaagga agaaaataat 1380
ccaagcctta agagacgtcc ttgcaagtgc actagagggc cagaaaccgt atatcatatc 1440
tatgtcagag aaaggggaag gtttgagatg gagtccattt acctgagggtc tagcaattta 1500
actctgaatg ctgtgaaggc tgctgttggt ttgaagttca catccctgaa tcttgtgcct 1560
gtatggaaga ctgaaaggcc tgaagttata agagggggga gtgctttaa actctacaaa 1620
```

atatacccaa ttggcttgac acagagacaa gctctttata ccttcagctt caaaggtgat 1680
 gctgatttca ggagtcactt ggagaacaat ccttgtgcca agtttgaagt catttttgtg 1740
 tagcatgcgc taaatggtac ctctgctcta cctgaattag cttcacttag ctgagcacta 1800
 gctagagttt taggaatgag tatggcagtg aatatggcat ggctttatct atgcctagtt 1860
 tcttgcccaa ctcatgatg ttttgtataa gacatcacac tttaatttta aacttggttc 1920
 tgtagaagtg caaatccata tttaatgctt agtttttagtg ctcttatctg atcatctaga 1980
 agtcacagtt cttgtatatt gtgagtga aa actgaaatct aatagaagga tcagatgttt 2040
 cactcaagac acattattac ttcatgttgt tttgatgatc tcgagctttt ttagtgtctg 2100
 gaactgtccc tgtggtttga gcacctgtta ttgcttcagt gttactgtcc agtggtttatc 2160
 gtttttgacc tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2198

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> Pflanze

<400> 2

Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Arg Gly Ser Arg Thr Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Gln Gln Asp Ser Leu Pro Val Leu Ala Pro Gly Gly Asn Pro Lys Arg
 20 25 30

Lys Trp Ser Asn Leu Met Pro Leu Val Val Ala Leu Val Val Ile Ala
 35 40 45

Glu Ile Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Met Ala Lys Asn Ala Ala Met
 50 55 60

Val Asp Ser Leu Ala Asp Phe Phe Tyr Arg Ser Arg Ala Val Val Glu
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Leu Gly Leu Gly Leu Val Ala Ser Asp Arg Asn Ser Glu
 85 90 95

Ser Tyr Ser Cys Glu Glu Trp Leu Glu Arg Glu Asp Ala Val Thr Tyr
 100 105 110

Ser Arg Gly Phe Ser Lys Glu Pro Ile Phe Val Ser Gly Ala Asp Gln
 115 120 125

Glu Trp Lys Ser Cys Ser Val Gly Cys Lys Phe Gly Phe Ser Gly Asp
 130 135 140

Arg Lys Pro Asp Ala Ala Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ser Ile Leu Arg Ser Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn

[illegible]

- 38 -

420 425 430
 Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
 435 440 445
 —
 Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
 450 455 460
 Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
 465 470 475 480
 Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
 485 490 495
 Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
 500 505 510

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:cDNA

<400> 3

gaagccctga agcactacaa atttagctta gcgtttgaaa attcgaatga ggaagattat 60
 gtaactgaaa aattcttcca atcccttggt gctggaactg tccct 105

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 4

Glu Ala Leu Lys His Tyr Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn
 1 5 10 15

Glu Glu Asp Tyr Val Thr Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly
 20 25 30

Thr Val Pro
 35

- 39 -

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 5

Lys Pro Asp Ala Xaa Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Thr Ala Ser

1

5

10

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 6

Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg

1

5

10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 7

Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn Ile Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

- 40 -

<400> 8

Gly Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu
1 5 10

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 9

gcngartayt aygcngaraa yaayathgc

29

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 10

crtadatrtg rtanacngty tc

22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 11

tadatnswyt ccatytcraa

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 12

ctggaactgt ccctgtggtt

20

- 41 -

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 13
agtgcactag agggccagaa 20

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 14
ttcgagcacc acaattggaa at 22

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 15
gaatgcaaag acggcacgat gaat 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 16
cggcggatcc gcaattgaat gatg 24

<210> 17
<211> 25
<212> DNA

- 42 -

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 17

ccggctgcag taccatttag cgcac

25

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.
2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, codiert.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 aufweist.
4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare umfasst.
5. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, insbesondere zumindest 95%, Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist.
6. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Teilsequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist.

7. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.
8. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst.
9. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst.
10. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst.
11. DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, dadurch gekennzeichnet, dass es zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird.
12. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 oder 11 umfasst.
13. Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotylzellen, isoliert wird, mit der nach Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird.
14. Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einen Vektor kloniert wird, der an-

schließlich in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren.

15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest einer der Vektoren gemäß Anspruch 8, 9 oder 12 in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird.

16. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, dadurch gekennzeichnet, dass das DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird.

17. Rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

18. Rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

19. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon ist.

20. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon entspricht.

21. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass PNA-Moleküle gemäß Anspruch 19 oder 20 in die Zellen eingeschleust werden.
22. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
23. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
24. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
25. Rekombinante Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.
26. Rekombinante humane Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 23 in pflanzlichen

oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

27. Rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 24 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie rekombinante Glykoproteine nach einem der Ansprüche 25 bis 27 umfasst.

29. Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass DNA-Moleküle gemäß Anspruch 7 zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus umfasst.

31. DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 29 oder 30 selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden.

32. Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 kloniert wurde, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.0 und 9.0, insbesondere zwischen 6.8 und 8.2, aufweist.

33. Präparation nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass

sie Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 aufweist.

34. Verfahren zur Herstellung von verpflanzlichten Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codierte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird.

1/16

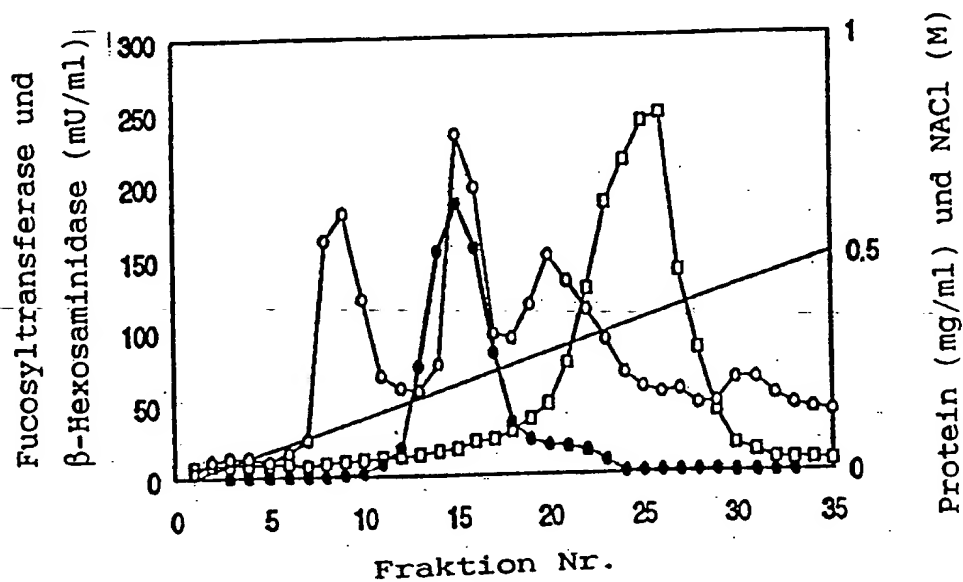


FIG.1 a

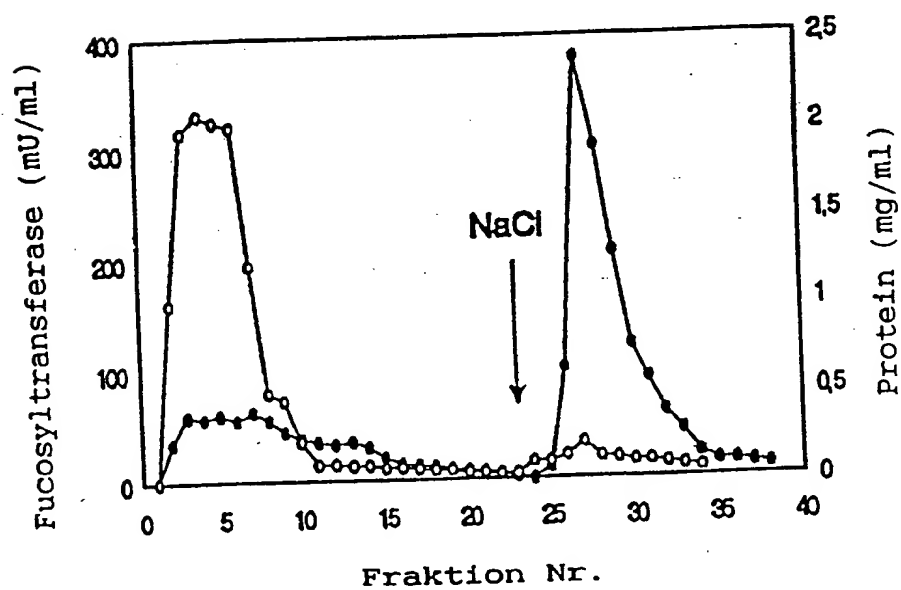


FIG.1 b

2/16

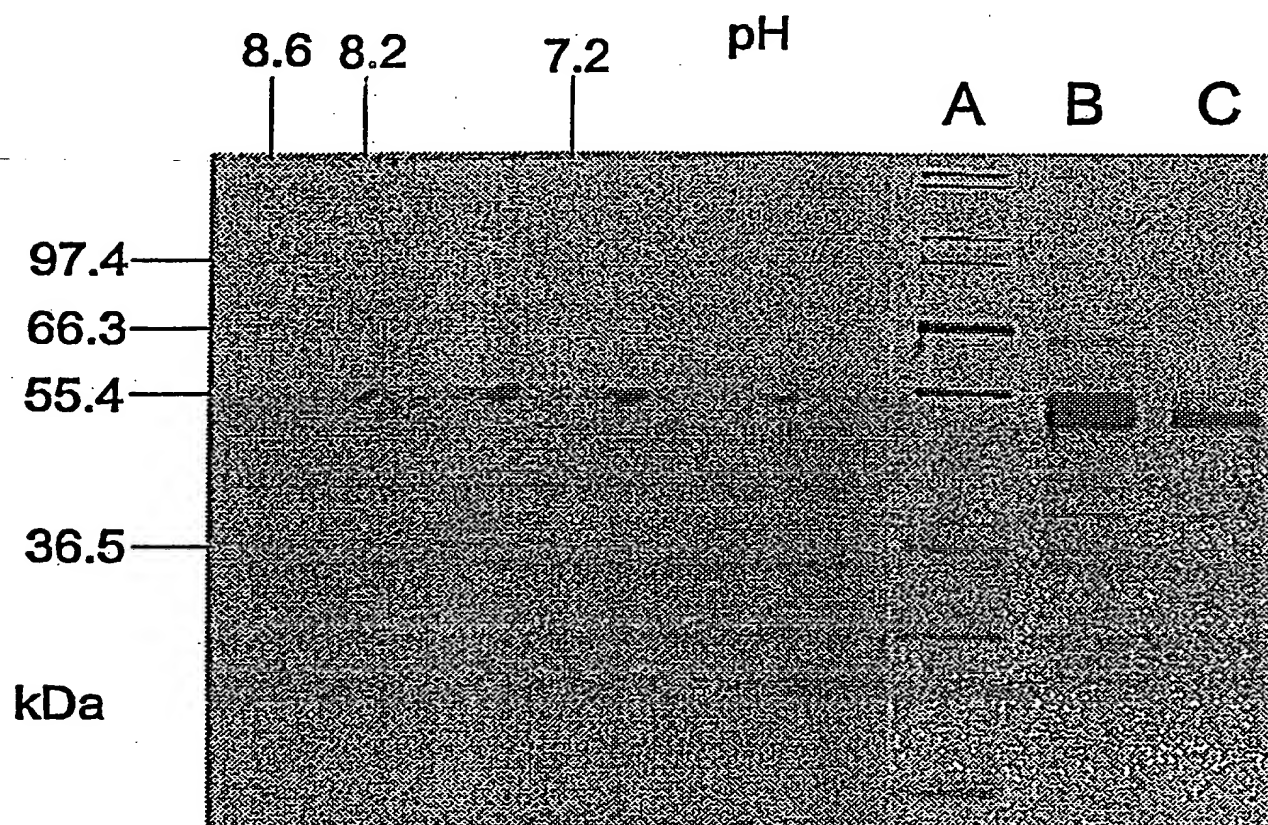
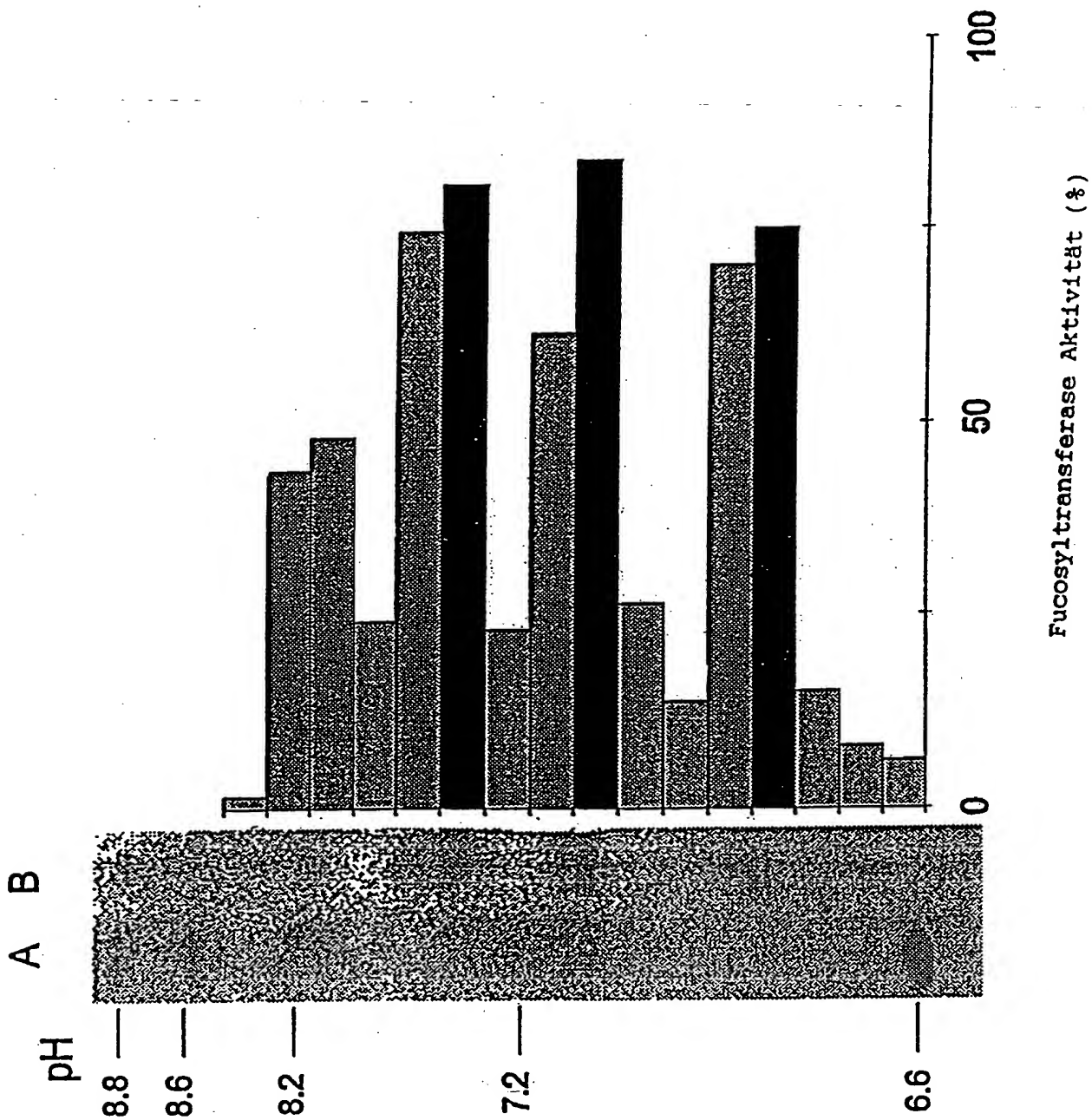


FIG.2

3/16

FIG.3



4/16

1 KPDA~~x~~FGLPQPSTAS
2 PETVYHIYVR
3 MESA EYYAENNIA
4 GRFEMESIYL

S1 5'- GCIGAATACTACGCIGAAAACAACAT^ACGC -3'
 G T T G T T T

A2 5'- CATAG^AATATGATAIACIGTCTC -3'
 G T G G T

A3 5'- TAG^AATICA^TCTCCATCTCAAA -3'
 T GTT T G

FIG.4

5/16

ACTAACTCAA	ACGCTGCATT	TTCTTTTTTC	TTTCAGGGAA	CCATCCACCC	ATAACAACAA	60
AAAAAACAAC	AGCAAGCTGT	GTTTTTTTTA	TCGTTCTTTT	TCTTTAAACA	AGCACCCCCA	120
TCATGGAATC	GTGCTCATAA	CGCCAAAATT	TTCCATTTC	CTTTGATTTT	TAGTTTATTT	180
TGCGGAATTG	GCAGTTGGGG	GCGCAATTGA	ATGATGGGTC	TGTTGACGAA	TCTTCGAGGC	240
TCGAGAACAG	ATGGTGCCCA	ACAAGACAGC	TTACCCGTTT	TGGCTCCGGG	AGGCAACCCA	300
AAGAGGAAAT	GGAGCAATCT	AATGCCTCTT	GTTGTTGCCC	TTGTGGTCAT	CGCGGAGATC	360
GCGTTTCTGG	GTAGGTTGGA	TATGGCCAAA	AACGCCGCCA	TGGTTGACTC	CCTCGCTGAC	420
TTCTTCTACC	GCTCTCGAGC	GGTCGTTGAA	GGTGACGATT	TGGGGTTGGG	TTTGGTGGCT	480
TCTGATCGGA	ATTCTGAATC	GTATAGTTGT	GAGGAATGGT	TGGAGAGGGA	GGATGCTGTC	540
ACGTATTCGA	GGGGCTTTTC	CAAAGAGCCT	ATTTTTGTTT	CTGGAGCTGA	TCAGGAGTGG	600
AAGTCGTGTT	CGGTTGGATG	TAAATTTGGG	TTTAGTGGGG	ATAGAAAGCC	AGATGCCGCA	660
TTTGGGTTAC	CTCAACCAAG	TGGAACAGCT	AGCATTCTGC	GATCAATGGA	ATCAGCAGAA	720
TACTATGCTG	AGAACAATAT	TGCCATGGCA	AGACGGAGGG	GATATAACAT	CGTAATGACA	780
ACCAGTCTAT	CTTCGGATGT	TCCTGTTGGA	TATTTTTTCAT	GGGCTGAGTA	TGATATGATG	840
GCACCAGTGC	AGCCGAAAAC	TGAAGCTGCT	CTTGCAGCTG	CTTTCATTTC	CAATTGTGGT	900
GCTCGAAATT	TCCGTTGCA	AGCTCTTGAG	GCCCTTGAAA	AATCAAACAT	CAAAATTGAT	960
TCTTATGGTG	GTTGTCACAG	GAACCGTGAT	GGAAGAGTGA	ACAAAGTGGA	AGCCCTGAAG	1020
CACTACAAAT	TTAGCTTAGC	GTTTGAAAAT	TCGAATGAGG	AAGATTATGT	AACTGAAAAA	1080
TTCTTCCAAT	CCCTTGTTGC	TGGAAGTGTC	CCTGTGGTTG	TTGGTGCTCC	AAATATTCAG	1140

FIG.5 a

6/16

GACTTTGCTC	CTTCTCCTGG	TTCAATTTTA	CATATTAAAG	AGATAGAGGA	TGTTGAGTCT	1200
GTTGCAAAGA	CCATGAGATA	TCTAGCAGAA	AATCCCGAAG	CATATAATCA	ATCATTGAGG	1260
TGGAAGTATG	AGGGTCCATC	TGACTCCTTC	AAGGCCCTTG	TGGATATGGC	AGCTGTGCAT	1320
TCATCGTGCC	GTCTTTGCAT	TCACTTGGCC	ACAGTGAGTA	GAGAGAAGGA	AGAAAATAAT	1380
CCAAGCCTTA	AGAGACGTCC	TTGCAAGTGC	ACTAGAGGGC	CAGAAACCGT	ATATCATATC	1440
TATGTCAGAG	AAAGGGGAAG	GTTTGAGATG	GAGTCCATTT	ACCTGAGGTC	TAGCAATTTA	1500
ACTCTGAATG	CTGTGAAGGC	TGCTGTTGTT	TTGAAGTTCA	CATCCCTGAA	TCTTGTGCCT	1560
GTATGGAAGA	CTGAAAGGCC	TGAAGTTATA	AGAGGGGGGA	GTGCTTTAAA	ACTCTACAAA	1620
ATATACCCAA	TTGGCTTGAC	ACAGAGACAA	GCTCTTTATA	CCTTCAGCTT	CAAAGGTGAT	1680
GCTGATTTCA	GGAGTCACTT	GGAGAACAAT	CCTTGTGCCA	AGTTTGAAGT	CATTTTTGTG	1740
TAGCATGCGC	TAAATGGTAC	CTCTGCTCTA	CCTGAATTAG	CTTCACTTAG	CTGAGCACTA	1800
GCTAGAGTTT	TAGGAATGAG	TATGGCAGTG	AATATGGCAT	GGCTTTATTT	ATGCCTAGTT	1860
TCTTGGCCAA	CTCATTGATG	TTTTGTATAA	GACATCACAC	TTTAATTTTA	AACTTGTTTC	1920
TGTAGAAGTG	CAAATCCATA	TTTAATGCTT	AGTTTTAGTG	CTCTTATCTG	ATCATCTAGA	1980
AGTCACAGTT	CTTGTATATT	GTGAGTGAAA	ACTGAAATCT	AATAGAAGGA	TCAGATGTTT	2040
CACTCAAGAC	ACATTATTAC	TTCATGTTGT	TTTGATGATC	TCGAGCTTTT	TTAGTGTCTG	2100
GAACTGTCCC	TGTGGTTTGA	GCACCTGTTA	TTGCTTCAGT	GTTACTGTCC	AGTGTTATC	2160
GTTTTTGACC	TCTAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA			2198

FIG.5 b

7/16

Met	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Ala	1	5	10	15
Gln	Gln	Asp	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Asn	Pro	Lys	Arg	20	25	30	
Lys	Trp	Ser	Asn	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Ala	35	40	45	
Glu	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Met	Ala	Lys	Asn	Ala	Ala	Met	50	55	60	
Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Glu	65	70	75	80
Gly	Asp	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Asp	Arg	Asn	Ser	Glu	85	90	95	
Ser	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Trp	Leu	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr	100	105	110	
Ser	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Glu	Pro	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Gln	115	120	125	
Glu	Trp	Lys	Ser	Cys	Ser	Val	Gly	Cys	Lys	Phe	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp	130	135	140	
Arg	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	145	150	155	160
Ser	Ile	Leu	Arg	Ser	Met	Glu	Ser	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Asn	Asn	165	170	175	
Ile	Ala	Met	Ala	Arg	Arg	Arg	Gly	Tyr	Asn	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Ser	180	185	190	
Leu	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Val	Gly	Tyr	Phe	Ser	Trp	Ala	Glu	Tyr	Asp	195	200	205	
Met	Met	Ala	Pro	Val	Gln	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	210	215	220	
Phe	Ile	Ser	Asn	Cys	Gly	Ala	Arg	Asn	Phe	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	225	230	235	240
Ala	Leu	Glu	Lys	Ser	Asn	Ile	Lys	Ile	Asp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Cys	His				

FIG.6 a

8/16

Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr
 260 265 270
 Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr
 275 280 285
 Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val
 290 295 300
 Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu
 305 310 315 320
 His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg
 325 330 335
 Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys
 340 345 350
 Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala
 355 360 365
 Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg
 370 375 380
 Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys
 385 390 395 400
 Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly
 405 410 415
 Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu
 420 425 430
 Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
 435 440 445
 Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
 450 455 460
 Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
 465 470 475 480
 Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
 485 490 495
 Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
 500 505 510

FIG.6 b

9/16

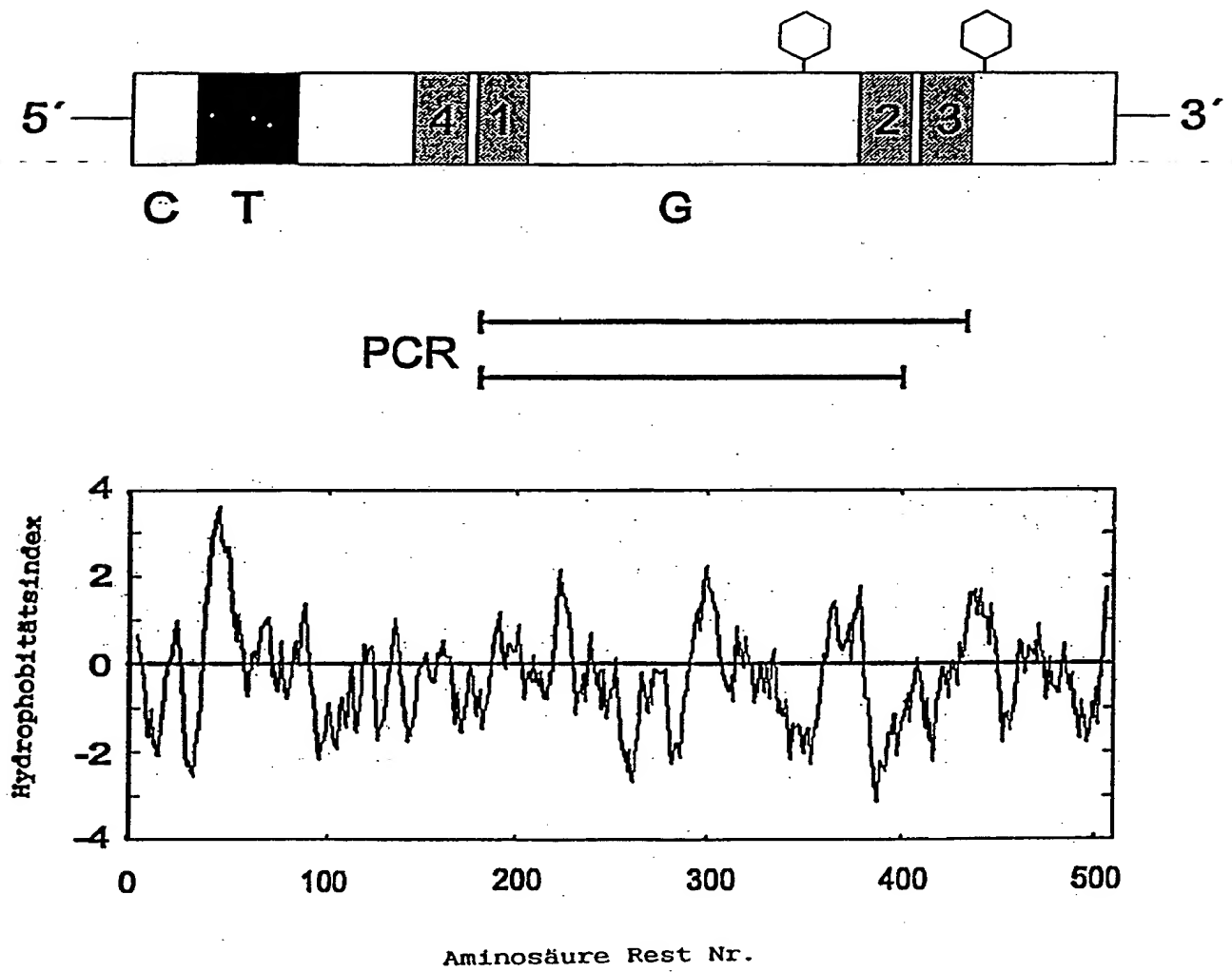


FIG.7



10/16

Transferase	Art	# ^a	konserviertes Motiv
FucT-C3	Mungo Bohne		267-EALKHYKFSIAFENSNEEDYVTEKFFQ-SLVAGTVP
FucT-III	Mensch	P21217	236-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-III	Schimpanse	O19058	247-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-V	Mensch	Q11128	249-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-V	Schimpanse	P56433	249-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-VI	Mensch	P51993	235-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-VI	Schimpanse	P56434	235-ETLSRYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-III	Rind	Q11126	240-KQLSQYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALQAWAVP
FucT-?	chin. Hamster	O35886	237-GTLARYKFFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVP
FucT-VII	Mensch	Q11130	217-PTVAQYRFFYLSFENSQHRDYITEKFWRNALVAGTVP
FucT-VII	Maus	Q11131	264-PTLARYRFFYLAFENSQHRDYITEKFWRNALAAGAVP
FucT-VII	<i>Schistosoma mansoni</i>	O76204	226-PTLARYRFFYLAFENSQHRDYITEKFWRNALAAGAVP
FucT-IV	Mensch	P22083	277-HTVARYKFFYLAFENSQHLDYITEKLWRNALLAGAVP
FucT-IV	Maus	Q11127	305-HTVARYKFFYLAFENSQRHVDYITEKLWRNAFLAGAVP
FucT-IV	Ratte	Q62994	305-HTVARYKFFYLAFENSQHVVDYITEKLWRNAFLAGAVP
FucT-IV	Huhn	Q98952	228-KTVSAYKFFYLAFENSQHTDYITEKLWKNFAAASAVP
FucT-IX	Maus	O88819	233-PTISTCKFFYLSFENSIHKDYITEKLYNAFL-AGSVP
FucA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	O76544	247-DVLKRNYFAIAFENSLCKDYITEKLWE-SLSVGTIP
hpFucT1	<i>Helicobacter pylori</i>	O32631	106-EFSLQYKFNLCFENSQGYGVTEKILD-AYFSHTIP
hpFucT2	<i>Helicobacter pylori</i>	O30511	227-EFSLQYKFNLCFENTQGYGVTEKI ID-AYFSHTIP
CEFT-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q21362	303-MLDDTDYHFYVTFENSICEDYVTEKLWKSGYQNTIIP

^a Zugriffsnummer für die SwissProt Protein Sequenz Datenbank

FIG.8

11/16

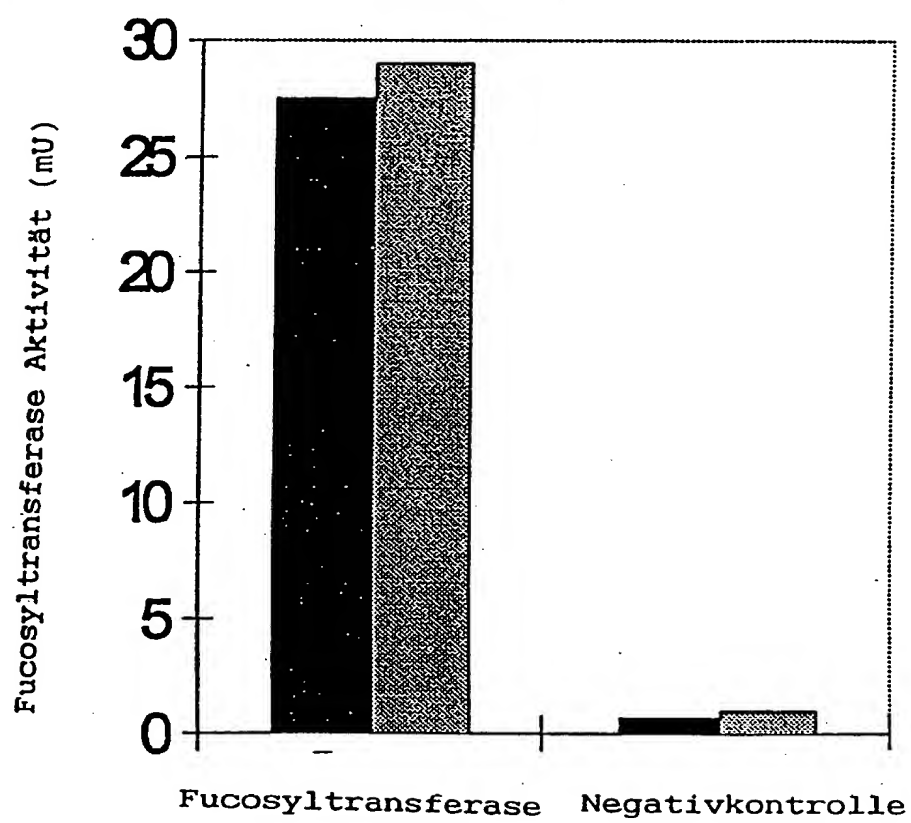


FIG.9

12/16

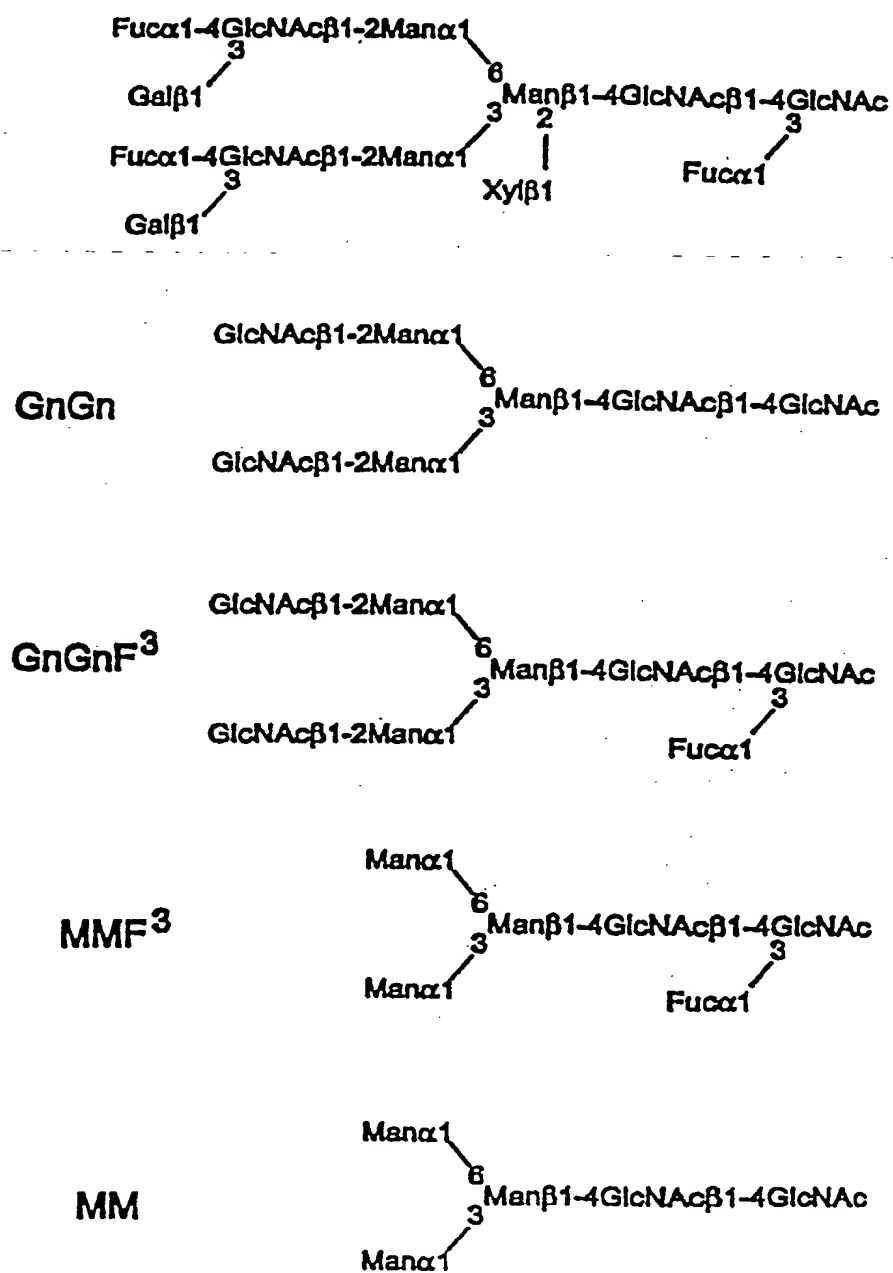


FIG.10 a

14/16

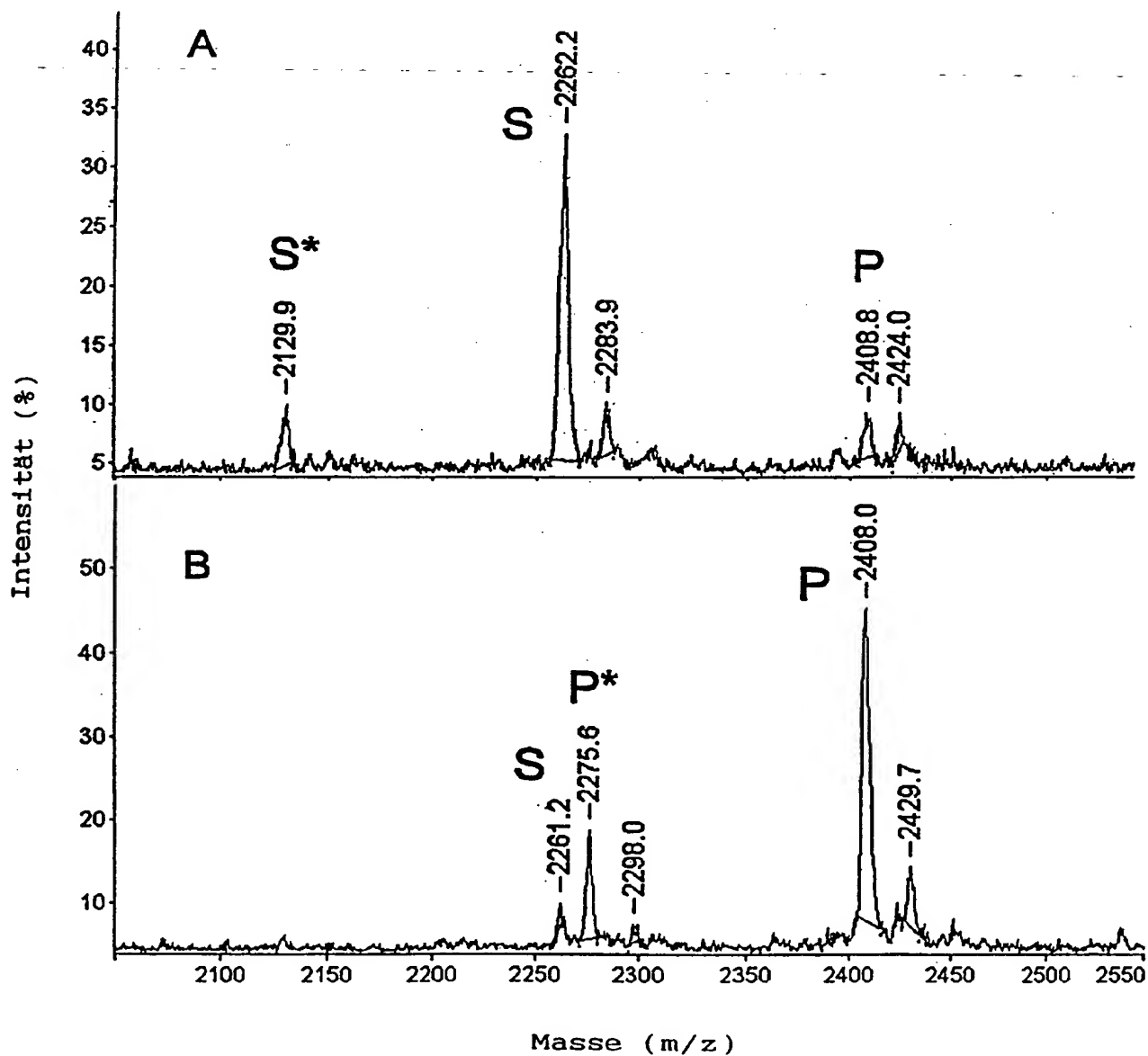
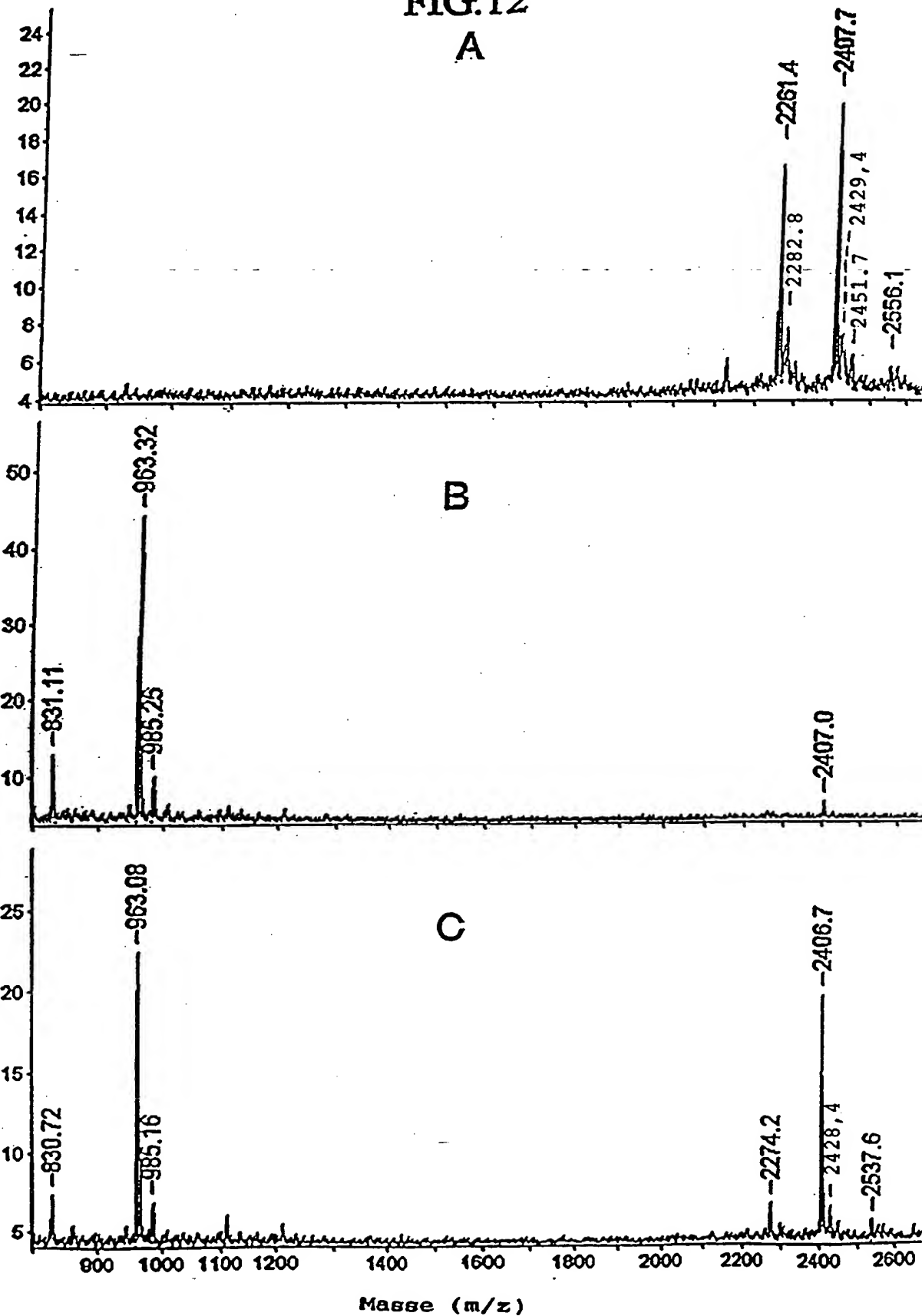


FIG.11

15/16

FIG. 12



16/16

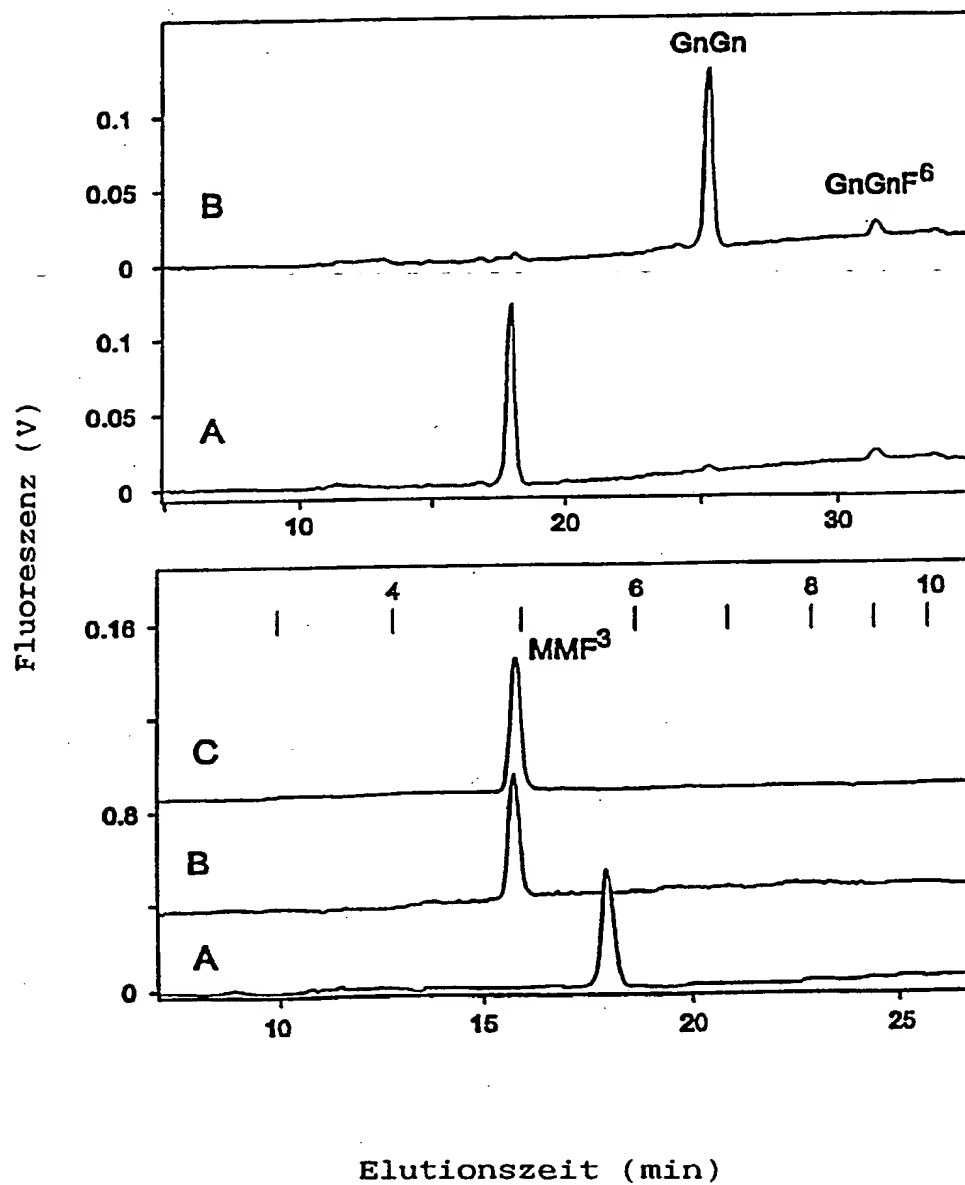


FIG.13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte lional Application No
PCT/AT 00/00040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/11 C12N9/00 C12N5/10
C12P21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STAUDACHER E. ET AL.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha-1,3-fucosyltransferase from mung beans"</p> <p>GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 12, 1995, pages 780-786, XP002140246 cited in the application</p> <p>page 782, left-hand column, paragraph 3</p> <p>page 783, left-hand column</p> <p>page 785 -page 786</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	32-34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2000

Date of mailing of the international search report

19/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte lional Application No
PCT/AT 00/00040

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 14, 1997, pages 643-646, XP002140795 page 645, left-hand column, paragraph 3	25-28
X	LEROUGE P. ET AL.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 38, 1998, pages 31-48, XP002140796 cited in the application page 44 -page 45	25-28
X	EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997 72% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1102 bis bp.1596, in inverser Orientierung XP002140249 the whole document	1,3,6, 8-10,12
X	EMBL Database ID: AQ158899 AC: AQ158899 Oryza sativa 09/09/1998 63% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.591 bis bp.776 XP002140250 the whole document	1,6,8, 10,12
X	EMBL Database ID: AQ328306 AC: AQ328306 Oryza sativa 11/01/1999 65% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1486 bis bp.1718, in inverser Orientierung XP002140251 the whole document	1,6, 8-10,12
P,X	LEITER H. ET AL.: "Purification, cDNA cloning and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha-1,3-Fucosyltransferase from mung bean" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 31, 30 July 1999 (1999-07-30), pages 21830-21839, XP002140245 the whole document	1-8,13, 14,29-34
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/AT 00/00040

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>EMBL Database ID: VRA18529 AC: Y18529 Vigna radiata mRNA für alpha-1,3-fucosyltransferase (FucT c3) 03/08/1999 99.8% Identität mit SEQ ID NO 1 bp. 1 bis bp. 2198 XP002140629 the whole document</p>	1-5, 10, 31-33
A	<p>STAUDACHER E.: "alpha1,3-fucosyltransferases" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, vol. 8, no. 44, November 1996 (1996-11), pages 391-408, XP000921149 page 400, left-hand column, paragraphs D-4. page 401 -page 402 page 404 -page 405</p>	
A	<p>STAUDACHER E. AND MÄRZ L.: "Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 15, 1998, pages 355-360, XP002140247 cited in the application page 356, right-hand column, paragraph 2</p>	34
A	<p>CRAWLEY S.C. ET AL.: "A plant fucosyltransferase with human Lewis blood-group specificity" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 193, 1989, pages 249-256, XP002140248</p>	
A	<p>JAMES D.C. ET AL.: "N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems" BIO/TECHNOLOGY, vol. 13, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 592-596, XP000609442 ISSN: 0733-222X page 595, left-hand column, paragraph 3</p>	25-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00040

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/54 C12N9/10 C12N15/11 C12N9/00 C12N5/10
C12P21/00 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STAUDACHER E. ET AL.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha-1,3-fucosyltransferase from mung beans" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 12, 1995, Seiten 780-786, XP002140246 in der Anmeldung erwähnt Seite 782, linke Spalte, Absatz 3 Seite 783, linke Spalte Seite 785 -Seite 786 --- -/-	32-34



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

19/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte.ionales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00040

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 14, 1997, Seiten 643-646, XP002140795 Seite 645, linke Spalte, Absatz 3	25-28
X	LEROUGE P. ET AL.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 38, 1998, Seiten 31-48, XP002140796 in der Anmeldung erwähnt Seite 44 -Seite 45	25-28
X	EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997 72% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1102 bis bp.1596, in inverser Orientierung XP002140249 das ganze Dokument	1,3,6, 8-10,12
X	EMBL Database ID: AQ158899 AC: AQ158899 Oryza sativa 09/09/1998 63% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.591 bis bp.776 XP002140250 das ganze Dokument	1,6,8, 10,12
X	EMBL Database ID: AQ328306 AC: AQ328306 Oryza sativa 11/01/1999 65% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1486 bis bp.1718, in inverser Orientierung XP002140251 das ganze Dokument	1,6, 8-10,12
P,X	LEITER H. ET AL.: "Purification, cDNA cloning and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha-1,3-Fucosyltransferase from mung bean" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 31, 30. Juli 1999 (1999-07-30), Seiten 21830-21839, XP002140245 das ganze Dokument	1-8,13, 14,29-34

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>EMBL Database ID: VRA18529 AC: Y18529 Vigna radiata mRNA für alpha-1,3-fucosyltransferase (FucT c3) 03/08/1999 99.8% Identität mit SEQ ID NO 1 bp. 1 bis bp. 2198 XP002140629 das ganze Dokument</p>	1-5,10, 31-33
A	<p>STAUDACHER E.: "alpha1,3-fucosyltransferases" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, Bd. 8, Nr. 44, November 1996 (1996-11), Seiten 391-408, XP000921149 Seite 400, linke Spalte, Absätze D-4. Seite 401 -Seite 402 Seite 404 -Seite 405</p>	
A	<p>STAUDACHER E. AND MÄRZ L.: "Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 15, 1998, Seiten 355-360, XP002140247 in der Anmeldung erwähnt Seite 356, rechte Spalte, Absatz 2</p>	34
A	<p>CRAWLEY S.C. ET AL.: "A plant fucosyltransferase with human Lewis blood-group specificity" CARBOHYDRATE RESEARCH, Bd. 193, 1989, Seiten 249-256, XP002140248</p>	
A	<p>JAMES D.C. ET AL.: "N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems" BIO/TECHNOLOGY, Bd. 13, Nr. 6, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 592-596, XP000609442 ISSN: 0733-222X Seite 595, linke Spalte, Absatz 3</p>	25-28

